

Regulation der Sphingolipide und Entzündungsprozesse in immunologisch relevanten Zellen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Olga Arlt
aus Frunse



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

- 1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß
- 2. Referentin: Prof. Dr. M. Cristina Cardoso
- 3. Referent: Prof. Dr. Heinfried H. Radeke

Tag der Einreichung: 31.03.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

Darmstadt 2015

D17

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Das Immunsystem	3
2.1.1 Dendritische Zellen	6
2.1.2 „Toll-like“ Rezeptoren	8
2.1.3 TNF- α -vermittelte Signaltransduktion	11
2.1.4 Zytokine	13
2.2 Übersicht der Lipide und ihrer Funktionen	16
2.2.1 Sphingolipide	17
2.2.2 Sphingosin 1-Phosphat	19
2.2.3 S1P Lyase	23
2.2.4 Die Sphingosinkinasen	24
2.2.5 Sphingolipide in der Apoptose	26
2.3 Ziele dieser Doktorarbeit	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Verwendete Mauslinien	28
3.1.1 Der WT-C57BL/6-Stamm	28
3.1.2 SphK1 ^{-/-} -Mäuse	28
3.1.3 WT- und SphK1 ^{-/-} -Mäuse auf BALB/c-Hintergrund	28
3.1.4 Tamoxifen induzierbare Kontroll- und S1P Lyase-defiziente Mäuse	29
3.2 Zellbiologische Methoden	30
3.2.1 Isolierung muriner primärer Zellen aus der Milz	30
3.2.2 Isolierung und Differenzierung von murinen primären Zellen aus dem Knochenmark	31
3.2.3 Kultivierung und Stimulation der inkubierten Zellen aus Milz und KM	32
3.2.4 Einkonzentrieren der Überstände für Zytokin-Konzentrationsmessungen	33
3.2.5 Proteinisolation aus Gesamtzelllysat stimulierter muriner KM-DCs	33
3.2.6 Bestimmung der Konzentration isolierter Proteine	34
3.2.7 Lipid-Extraktion und Messung der Sphingolipide mittels LC-MS/MS	35
3.2.8 Bestimmung der S1P Lyase-Aktivität durch die (2E)-Hexadecenal-Menge	36

3.2.9	Calciumkonzentrations-Messungen mittels Spektrofluorometrie	38
3.3	Immunologische Methoden	39
3.3.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	39
3.3.2	SDS-Page	40
3.3.3	Western Blot	41
3.3.4	Ubiquitin Assay	44
3.3.5	Durchflusszytometrie	46
3.4	Molekularbiologische Methoden	46
3.4.1	DNA Isolierung	46
3.4.2	RNA Isolierung	47
3.4.3	cDNA-Synthese	48
3.4.4	Qualitative PCR	48
3.4.5	Quantitative Realtime-PCR	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Untersuchungen einer Interaktion von TRAF2 mit TRAF6 durch TNF-α-Stimulation und intrazelluläres S1P sowie Überprüfung einer TNF-α-Aktivität in KM-DCs	54
4.1.1	Einfluss der Ko-Inkubation von TNF- α auf die Zytokin-Produktion muriner KM-DCs als Messinstrument einer möglichen Interaktion von TRAF2 mit TRAF6	54
4.1.2	Analyse der TNF- α -Wirksamkeit auf die TRAF2-Ubiquitinierung, die IL-6 Sekretion und Apoptose in murinen KM-DCs	60
4.2	Analyse einer zeitabhängigen S1P_e-induzierten IL-12p35- und IL-12p70-Reduktion und Austestung von S1P-neutralisierenden Spiegelmeren	63
4.2.1	Untersuchungen zu zeitabhängigen Wirkungen des extrazellulären S1P auf die IL-12p35- und IL-12p70-Produktion	64
4.2.2	Austestung der S1P-Spiegelmere mittels Calcium- und Zytokinmessungen	67
4.3	Auswirkungen der TLR-Stimulation auf die Regulation S1P metabolisierender Enzyme und die damit verbundene Induktion des Sterbens dendritischer Zellen	71
4.3.1	Reduzierte Expression der S1P Lyase nach TLR-Aktivierung in KM-DCs	72
4.3.2	Produktion inflammatorischer Zytokine als Antwort auf die TLR-Stimulation	74
4.3.3	Einfluss der Langzeit-Kultivierung dendritischer Zellen auf die Expression S1P-relevanter Enzyme sowie auf zellulären Gehalt der Sphingolipide	82
4.3.4	Funktionelle Bedeutung der TLR-induzierten SPL-Reduktion und Sphingosin-Zunahme	86
4.3.5	Ausschalten der S1P Lyase durch Tamoxifen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	90

4.3.6	Hemmung der S1P Lyase durch 4-Deoxypyridoxin <i>in vitro</i>	108
5	Diskussion	110
5.1	Einfluss der TNF- α -Stimulation auf die Zytokinsekretion muriner KM-DCs	111
5.2	Erweiterung der S1P _e -beeinflussten IL-12p70 Hemmung und dessen Neutralisation durch Spiegelmeren	114
5.3	Regulation der S1P-relevanten Enzyme durch TLR-Induktion und deren Assoziation mit dem aktivierungs-induzierten Zelltod dendritischer Zellen	117
6	Ausblick	127
6.1	Analysen zur weiteren TNF- α - und LPS-induzierten Interaktion von TRAF2 mit TRAF6 durch intrazelluläres S1P in KM-DCs	127
6.2	Austestung von S1P-neutralisierenden Spiegelmeren in KM-DCs	128
6.3	TLR-vermittelte Änderungen der S1P Enzym-Expression und die eingeleitete Reduktion des Überlebens der KM-DCs	128
7	Referenzen	130
8	Appendix	148
8.1	Abkürzungsverzeichnis	148
8.2	Abbildungsverzeichnis	151
8.3	Tabellenverzeichnis	153
8.4	Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	154
8.4.1	Veröffentlichungen	154
8.4.2	Kongressbeiträge	155
9	Danksagung	156
10	Lebenslauf	158
11	Ehrenwörtliche Erklärung	159

1 Zusammenfassung

An den Sphingolipid-Metaboliten sowie an ihren generierenden und produzierenden Enzymen wurde im letzten Jahrzehnt unabhängig voneinander ausgiebig geforscht. Die Sphingolipide sind in eine Vielzahl zellulärer und immunologischer, aber auch pathophysiologischer Prozesse involviert. Ein gutes Beispiel liefert das System der Lymphozyten-Wanderung entlang eines Sphingosin 1-Phosphat (S1P)-Gradienten. Hierbei werden immunmodulierende Wirkungen über das extrazelluläre S1P und dessen Bindung an die S1P-Rezeptoren ausgelöst. Diese unterscheiden sich in mancher Hinsicht von Effekten, welche durch intrazelluläres S1P innerhalb der Zellen generiert werden. Offene Fragen existieren jedoch bezüglich der Spezifität und Intensität der Wirkungen von intra- und extrazellulärem S1P auf Immunzellen. Aufgrund der Hinweise über pro-inflammatorische Effekte des intrazellulären S1P, gegenüber denen des extrazellulären S1P, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die Ersteren in murinen dendritischen Zellen (DCs) des Immunsystems untersucht. Die Analysen basierten auf einer TNF- α -Ko-Stimulation sowie Untersuchungen der dadurch hervorgerufenen Zytokin-Produktion. Tendenziell war der zelluläre Einfluss von S1P von dessen extrazellulär-anti-inflammatorischen Effekten kaum unterscheidbar gewesen. Aus diesem Grund wurden des Weiteren die bekannten Effekte des extrazellulären S1P zunächst verifiziert und erweitert, so dass spezifische S1P-neutralisierende Spiegelmerer eingesetzt werden konnten. Da diese den Effekt auf das pro-inflammatorische Zytokin schwach umkehren konnten, war nun die stimulationsbedingte Regulation der S1P Lyase, welche S1P irreversibel degradiert, von besonderem Interesse. Lediglich eine geringe Anzahl an Publikationen konnte bisher eine detailgetreue zusammenhängende Analyse der Sphingolipide und deren Enzyme in Immunzellen beschreiben. Die hier vorliegenden Studien wurden ebenfalls in immunkompetenten dendritischen Zellen, welche Pathogenstrukturen durch keimbahnkodierende Rezeptoren erkennen und durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine T-Zellen aktivieren, bewerkstelligt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine klassische pro-entzündliche Stimulation solcher keimbahnkodierender Rezeptoren auf DCs nicht nur einen Zytokinsturm veranlasst, sondern auch gravierende Veränderungen der S1P Lyase sowie anderer untersuchten S1P-relevanten-Enzyme auf mRNA-Ebene mit sich bringt. Die Regulation der Enzyme

wurde über die gesamte Lebensspanne der aktivierten und ruhenden DCs *in vitro* untersucht. Begleitet wurden die Analysen durch Messungen der zellulären Konzentrationen des entscheidenden S1P und Sphingosin (der Vorgänger des S1P im Sphingolipid-Metabolismus). Diese beiden Metaboliten können durch reversible katalytische Aktivität der Enzyme ineinander übergehen, um in der Zelle eine höchst erforderliche Balance zu erhalten. Nach einer längeren (beinahe chronischen) Aktivierung der DCs wird diese Balance jedoch in Richtung der zellulären Sphingosin-Akkumulation massiv beeinträchtigt und letztendlich begeht die Zelle einen sogenannten aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD), welcher auch in T-Zellen beschrieben wurde. Die Messung der Apoptose hat den maßgebenden Einfluss der gestörten Sphingolipid-Balance in DCs bestätigt. Auch wenn die S1P Lyase nach der DC-Aktivierung reduziert war, sowohl auf mRNA- als auch auf Aktivitätsebene, konnte in den Zellen ein Anstieg des S1P ausgeschlossen werden. Da S1P durch aktiven Transport in den Extrazellularraum gelangen kann, wurde dieser Transport im DC-System für möglich gehalten. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die durch eine klassische entzündliche Reaktion der DCs hervorgerufene spezifische und sensitive Regulation der Sphingolipid-Enzyme mit AICD in Verbindung gebracht. Diese Befunde sollten in der Zukunft bei der Entwicklung von weiteren Medikamenten und Therapien zur Bekämpfung, beispielsweise von Krebs-Erkrankungen, berücksichtigt werden. Diese Arbeit konnte zudem aufdecken, dass vorliegende physiologische intra- und extrazelluläre S1P-Mengen einander ständig beeinflussen und nicht voneinander abgegrenzt werden können, da neu gebildetes S1P aktiv aus der Zelle heraustransportiert werden kann. Für zukünftige Analysen der Effekte beider lokalisationsbedingter S1P-Typen empfiehlt es sich sowohl den Auswärtstransport als auch die Rezeptoren zu antagonisieren, zu blockieren oder defiziente Mäuse zu verwenden. Für den letzteren Fall wurde kürzlich ein Mausmodell generiert, mit dessen Hilfe die S1P Lyase spezifisch und zum erforderlichen Zeitpunkt ausgeschaltet werden kann. Diese Arbeit hat des Weiteren entscheidend dazu beigetragen die Vorgehensweise der S1P Lyase-Defizienz zukünftig *in vivo* anzuwenden.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist das Abwehrsystem, welches der Körper sich zu Nutze macht, um eingedrungene Krankheitserreger selbst zu bekämpfen. Im Allgemeinen wird es als Reaktion auf eine Infektion in die angeborene und adaptive Immunantwort eingeteilt.

Die angeborene Immunantwort wird innerhalb von Minuten eingeleitet und der Erreger wird zwischen 0 und 4 Stunden beseitigt. Dabei werden die im Laufe der Evolution konservierten Oberflächenmoleküle („**P**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**attern“, PAMPs) der Erreger durch bereits vorhandene keimbahnkodierende Rezeptoren („**P**attern **r**ecognition **r**eceptors“, PRRs) auf Immunzellen erkannt (Medzhitov and Janeway, JR, 2000). Unter diesen Rezeptoren sind Toll-ähnliche Rezeptoren („toll-like receptors“, TLRs) (Chen and Jiang, 2013), RIG-I-ähnliche Rezeptoren („retinoic acid-inducible gene I-like receptors“, RLRs) (Loo and Gale, 2011), C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren („C-type lectin receptors“, CLRs) (Lepeniev et al., 2013) und NOD-ähnliche Rezeptoren („Nucleotide-binding oligomerization domain receptors“, NLRs) (Proell et al., 2008; Krishnaswamy et al., 2013). Folglich wird die Produktion der Zytokine als „Botenstoffe“ der Entzündung induziert, welche die Entzündungsreaktion regulieren und eine adaptive Immunantwort einleiten können (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Die wichtigsten Eigenschaften der angeborenen Immunität sind zum einen das Einschalten der Infektion und zum anderen wird dabei jedoch kein Langzeitschutz gewährleistet, da kein immunologisches Gedächtnis vorhanden ist. Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, überwinden die natürlichen Barrieren und gelangen über die typischen Infektionswege (Schleimhäute und äußere Epithelien) in den Körper. Die wichtigste Frontlinie der Immunologie bilden dabei die Immunzellen der angeborenen Immunität: Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen (DCs) und NK- („**n**atural **k**iller“-)-Zellen. Die ersten drei Zelltypen sind in der Lage den Erreger zu phagozytieren. Gleichzeitig setzen sie Zytokine und Chemokine frei, welche andere Zellen zum Infektionsherd anlocken. DCs exprimieren ko-stimulatorische Moleküle und präsentieren in den sekundären lymphatischen Organen die prozessierten Antigene auf MHC („major

histocompatibility complex“)-Molekülen den T-Lymphozyten. NK-Zellen setzen bei der Erkennung von virusinfizierten Zellen zytotoxische und lytische Granula frei. Zusätzlich zählen zu der angeborenen Immunität das Komplementsystem und die kationischen antimikrobiellen Peptide (Janeway, 2001).

Die adaptive Immunantwort wird eingeleitet, wenn der Schwellenwert der Antigen-Menge überschritten wird und Effektorzellen, wie T- und B-Zellen, zum Entzündungsort gelangen, welche dann die Erreger beseitigen. Dabei erfolgt diese spätere Immunantwort (nach 96 Stunden bis zu 10 Tage) sehr spezifisch und entwickelt ein immunologisches Gedächtnis. Die T-Zellen vermitteln dabei eine zelluläre (Walter et al., 1995), wohingegen B-Zellen eine durch Antikörper induzierte humorale Immunität initiieren (Do, 2000).

Die spezifische Immunantwort wird durch die Aktivierung der T-Zellen eingeleitet, welche vom naiven in den aktivierten Zustand übergehen. In den sekundären lymphatischen Organen treffen zunächst naive T-Zellen auf die DCs, welche als antigenpräsentierende Zellen (APCs) ein bestimmtes Peptid:MHC-Komplex und kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche den T-Zellen präsentieren. Dabei unterscheiden sich die MHC-Moleküle, je nach dem welches Pathogen prozessiert wurde. Zytosolische Pathogene werden im Zytoplasma abgebaut und durch MHC-Klasse I-Moleküle den CD8-T-Zellen präsentiert. Diese zytotoxischen T-Zellen setzen Perforin und Granzyme frei und exprimieren den Fas-Liganden, wodurch die virusinfizierte Zelle abgetötet wird (Lowin et al., 1994). Extrazelluläre sowie intravesikuläre Pathogene werden in angesäuerten Vesikeln abgebaut und über MHC-Klasse II-Moleküle den CD4-T-Zellen präsentiert (Cresswell, 1994). Die CD4-T-Zellen aktivieren andere Zellen und unterteilen sich hauptsächlich in zwei Sub-Kategorien: Die T-Helferzellen (Th)1 und Th2. Die Th1-Zellen (auch inflammatorische T-Zellen genannt) aktivieren Makrophagen, so dass diese beschleunigt eingedrungene intravesikuläre Bakterien und Parasiten abtöten können. Die Th2-Zellen aktivieren B-Zellen, um Antikörper zu sezernieren und die extrazellulären Bakterien oder Toxine zu beseitigen (Murphy et al., 2008). Welche der beiden Haupt-Kategorien der T-Helferzellen gebildet werden, entscheidet sich schon während der angeborenen Immunreaktion durch die sezernierten Zytokine. Wird IL-12 in Verbindung mit IFN- γ sekretiert, differenzieren die

Th0-Zellen zu Th1. In Gegenwart von IL-4 werden hingegen Th2-Zellen ausdifferenziert. Des Weiteren unterscheidet man zwischen den Th17-, T_{reg}-, Th22- und Th9-Zellen (Kara et al., 2014). Wird die Zytokinsekretion der APCs dereguliert, können durch die fehlgeleiteten T-Zellen auch unterschiedliche Erkrankungen auftreten, wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen, Allergien und Krebs (**Abbildung 1**).

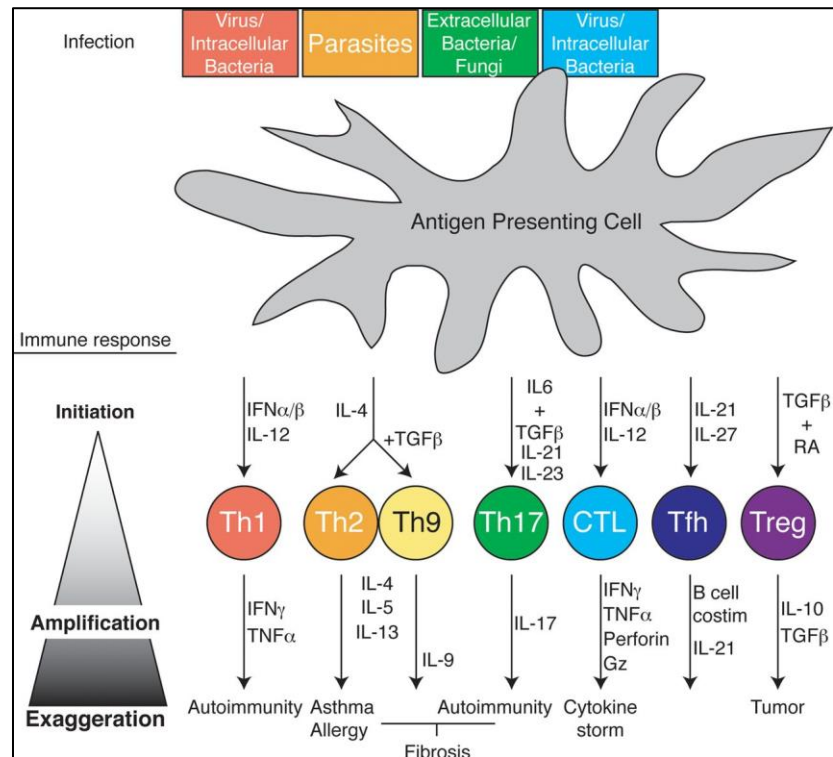


Abbildung 1: Die T-Zell-Differenzierung ist abhängig von der Art des eingedrungenen Pathogens und dem vorherrschenden Zytokinmilieu.

Tfh: folliculäre T-Helferzelle; Treg: regulatorische T-Helferzelle; CTL: zytotoxische T-Zelle. (Pennock et al., 2013)

Durch die B-Zellen wird die humorale Immunantwort induziert, indem diese durch T-Helferzellen aktiviert werden, spezifisch gegen das Antigen gerichtete Antikörper zu produzieren. Für die Aktivierung der B-Zellen sind zwei Signale notwendig. Das erste Signal ist die Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor und das zweite stellt die Bindung der T-Zelle an die MHC-Komplexe der B-Zelle zusammen mit dem CD40-Liganden dar. Die unterschiedlichen Antikörper haben drei Funktionen: Einige sind in der

Lage Bakterien an dem Festsetzen an Zielzellen durch deren Neutralisierung zu hindern. Durch die Opsonisierung der Erreger wird die Phagozytose gefördert und andere Antikörper aktivieren das Komplementsystem, welches die Opsonisierung beschleunigen soll.

2.1.1 Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen stehen zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort als die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Diese wurden schon im Jahre 1973 aus einer Milzpräparation entdeckt, da sie einzigartige Dendriten ausbilden (Steinman and Cohn, 1973). Man hat die konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) zunächst als diejenigen differenziert, welche naive T-Zellen stimulieren können (Steinman and Witmer, 1978). Heute werden die DCs in weitere Kategorien eingeteilt und üben auch unterschiedliche Funktionen im Immunsystem aus (Shortman and Naik, 2007). Man unterscheidet zwischen cDCs, plasmazytoiden DCs (pDCs) (Onai et al., 2007), den Langerhans-Zellen (Romani et al., 1989) und den Monozyten-abstammenden DCs (Auffray et al., 2009b). DCs werden ursprünglich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks gebildet, welche dann in die myeloide und die lymphoide Zelllinie differenzieren (Traver et al., 2000; Liu et al., 2007). Aus der myeloiden Linie („common myeloid precursor“, CMP) entwickeln sich die Makrophagen-DC-Progenitor-Zellen („macrophage-DC progenitors“, MDPs) (Auffray et al., 2009a; Satpathy et al., 2012), welche entweder zu Monozyten oder weiter zu der allgemeinen DC-Progenitor-Zelllinie („common DC progenitor“, CDP) differenzieren können (Naik et al., 2007). Die daraus entstandenen Pre-DCs wandern dann in peripheres Gewebe und entwickeln sich zu den $CD8\alpha^+$ oder $CD11b^+$ cDCs (Naik et al., 2006). Die pDCs reifen dagegen im Knochenmark heran und wandern über das Blut in die peripheren Organe, wo diese zu den CCR9-positiven pDCs werden, wobei CCR9-negative DCs außerdem zu cDCs differenzieren können (Schlitzer et al., 2011). Die wichtigsten Wachstumsfaktoren für die DCs sind der Flt3 („Fms-like tyrosine kinase 3“)-Ligand und M-CSF („Macrophage-colony stimulating factor“) (Satpathy et al., 2012). Der Flt3-Ligand ist unabdingbar für die DC-Entwicklung (Schmid et al., 2010) und für

eine Art „steady state“ der DCs, wobei GM-CSF („Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor“) die Differenzierung von inflammatorischen DCs induziert (Seré et al., 2012). Des Weiteren ist der Flt3-Ligand in Verbindung mit IFN-I für die Differenzierung der pDCs aus der lymphoiden Linie von großer Bedeutung (Chen et al., 2013). Der Einsatz von GM-CSF *in vitro* lässt die Knochenmarkszellen hauptsächlich zu cDCs differenzieren (Kingston et al., 2009).

cDCs sind stark phagozytierende und antigenpräsentierende Zellen, welche Antigene in den peripheren Geweben aufnehmen und über afferente lymphatische Gefäße in die T-Zell-Zonen sekundärer lymphatischer Organe einwandern (Platt and Randolph, 2013; Teijeira et al., 2014). Die cDCs haben eine kurze Lebensspanne von 3 bis 5 Tagen und werden daher Flt3-Ligand-abhängig aus dem Knochenmark immer wieder ersetzt (McKenna et al., 2000; Kamath et al., 2002). Bei der Antigen-Aufnahme sind die gerade differenzierten DCs noch in einem unreifen Stadium und reifen erst dann heran wenn sie die Antigene prozessiert haben und MHC-Peptide sowie ko-stimulierende Moleküle heraufregulieren (Mellman and Steinman, 2001). Durch ihre spezifisch gerichtete Zytokinsekretion veranlassen sie zusätzlich eine spezifische T-Zell-Differenzierung. Die cDCs der Milz und Lymphknoten werden weiterhin in die CD8-positiven und CD8-negativen Sub-Populationen unterteilt (Vremec et al., 1992). Die CD8⁺ cDCs sind effiziente APCs von exogenen Antigenen auf MHCI-Molekülen, welche den CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden (Pooley et al., 2001), wohingegen die CD4⁺ cDCs möglicherweise CD4⁺ T-Zellen durch MHCII effizient aktivieren (Kamphorst et al., 2010). Vor allem aber sind die CD8⁺ cDCs die Hauptproduzenten des inflammatorischen Zytokins IL-12 (Shortman and Heath, 2010). Um jedoch eine Hyperinflammation und somit Autoimmunerkrankungen zu vermeiden, wird in DCs ein sogenannter aktivierungs-induzierter Zelltod („activation-induced cell death“, AICD) in Gang gesetzt (Wang et al., 2009).

pDCs unterscheiden sich grundsätzlich von den cDCs durch ihre runde Morphologie, Gen-Expression und Sekretion des Typ 1 Interferons nach Infektion viraler RNA oder DNA (Colonna et al., 2004). Diese Zellen können aus lymphoiden und myeloiden Vorläufern stammen (Sathe et al., 2013). pDCs sind keine Phagozyten und sind daher unfähig den CD4⁺ T-Zellen exogene Antigene zu präsentieren, obwohl sie MHCII-

Moleküle exprimieren (Reizis et al., 2011). Jedoch sekretieren sie IL-10, das für T-Zellen von Bedeutung ist (Liu, 2005). Des Weiteren exprimieren murine pDCs sowohl B220, Siglec-H als auch Bst2 (Blasius et al., 2006; Satpathy et al., 2012).

2.1.2 „Toll-like“ Rezeptoren

Die keimbahnkodierenden TLRs („Toll-like“ Rezeptoren) spielen bei der Erkennung und Initiierung der Immunität eine entscheidende Rolle (Janeway, Charles A Jr and Medzhitov, 2002). Diese wurden ursprünglich im Jahre 1996 als Transmembran-Proteine in *Drosophila* entdeckt, welche fungale Erreger erkannten und für die Ausbildung der embryonalen dorsoventralen Polaritätsachse essentiell waren (Lemaitre et al., 2012). Erst im Jahre 1998 wurde der TLR4 („Toll-like“ Rezeptor 4), welcher den Liganden Lipopolysaccharid (LPS) von gram-negativen Bakterien bindet, in Mäusen entdeckt (Poltorak et al., 1998). Heute hat man über Genomsequenzierungen 10 unterschiedliche TLRs im Menschen und 12 in Mäusen identifiziert (Park and Lee, 2013). Die TLRs sind integrale Membran-Glykoprotein-Rezeptoren vom Typ I, mit einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne, einer Transmembranhelix und der konservierten intrazellulären Signalgebungs-Domäne, welche zum humanen Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) und dem humanen IL-18 Rezeptor (IL-18R) homolog ist (Beutler et al., 2006). Die meisten TLRs sind Homodimere, wobei TLR1/2 und TLR2/6 Heterodimere sind (Dellacasagrande, 2009). Die Bindung an einen Liganden resultiert in der Ausbildung eines großen Rezeptor-Adaptor-Komplexes und der nachgeschalteten Expression und Produktion von inflammatorischen Zytokinen (**Abbildung 2**) (Akira et al., 2006). Zwei unterschiedliche Haupt-Signalwege konnten bisher identifiziert werden. Außer dem TLR3, wird die Signalgebung anderer TLRs zu MyD88 („myeloid differentiation factor 88“) über Mal („MyD88 adaptor-like“-Protein) geleitet. Die TLRs 1, 2, 4 und 6 benötigen den TIRAP („TIR domain-containing adaptor protein“) als einen Linker für die Bindung an MyD88. Diese rekrutieren sodann die IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK1, 2, 4), welche nach der Phosphorylierung und Dissoziation vom MyD88-Komplex den TRAF6/IKK-Komplex (TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor6/„inhibitor of nuclear factor- κ B“ (I κ B)-Kinase) und die MAP-Kinasen („mitogen-

Wird I κ B phosphoryliert, dissoziiert es vom Komplex und wird ubiquitiniert, was den schnellen proteasomalen Abbau fördert. Dies resultiert zugleich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher in den Zellkern transloziert und die Expression inflammatorischer Gene veranlasst. TAK1 aktiviert zusätzlich MAP-Kinasen, wie ERK1/2, JNK und die p38-MAP-Kinase, welche folglich weitere Transkriptionsfaktoren (AP-1, c-Jun und c-fos) triggern (Chang, 2010).

Der andere TLR3- und 4-vermittelte Signalweg wird durch die Aktivierung von TRIF („TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β “) / TICAM-1 („TIR domain-containing adaptor molecule-1“) und TRAM („TRIF-related adaptor molecule“)/TICAM-2 eingeleitet. Entweder kann dann über den RIP1 („Receptor interacting protein kinase1“)/TRAF6/TAK1-Komplex eine späte NF- κ B-Aktivierung erfolgen (Ofengeim and Yuan, 2013) oder die Signalgebung kann über TRAF3 und einen weiteren Komplex, den TBK1 („TRAF family member associated NF- κ B activator binding kinase 1“)/IKKi, aktiviert werden, welcher die Transkriptionsfaktoren IRF3 („interferon regulatory factor3“) und IRF7 in Gang setzt. Diese führen zur Expression von IFN- α und IFN- β (Kumar et al., 2009).

Sowohl Zellen des Immunsystems als auch andere Zelltypen exprimieren TLRs (Chang, 2010). Makrophagen und myeloide DCs exprimieren hauptsächlich die TLRs 2, 3, 4 und 8. Plasmazytoide DCs exprimieren jedoch präferenziell TLR7 und TLR9 (Kadowaki et al., 2001; Hornung et al., 2002). Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 11 sind in die äußere Zellmembran integriert und spezialisiert auf die extrazellulären Erreger. Die intrazellulären TLRs (TLR3, 7, 8, 9 und 13) befinden sich in endosomalen, lysosomalen und in den zum Endoplasmatischen Retikulum (ER)-gehörenden Membranen. Sie aktivieren das Immunsystem als Antwort auf intrazelluläre virale oder bakterielle RNA und DNA (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Reis e Sousa, Caetano, 2004). Es wurde kürzlich gezeigt, dass die intrazellulären TLRs mit einem UNC-93B-Molekül interagieren müssen, bevor eine anti-virale Antwort stattfinden kann (Conley, 2007). Dieses Molekül ist aus 598 Aminosäuren aufgebaut und besitzt 12 Transmembran-Domänen. Die Interaktion ist notwendig, um intrazelluläre TLRs (3, 7, 8 und 9) vom ER zu den Endolysosomen zu transportieren, so dass eine Immunantwort gegen ssRNA oder DNA gewährleistet werden kann (Chaturvedi and Pierce, 2009).

2.1.2.1 TLR4

Der TLR4 wurde als erster Rezeptor entdeckt und hat im Vergleich zu den anderen TLRs eine Besonderheit: Nach einer Stimulation durch LPS (aus der Membran von gram-negativen Bakterien) aktiviert dieser sowohl den MyD88- als auch den TRIF-abhängigen Signalweg. Das LPS wird zunächst an ein LBP („LPS-Bindeprotein“) gebunden und interagiert sodann mit CD14, welches an TLR4 und MD-2 bindet. Dies verstärkt die Detektion von LPS durch TLR4 (Park and Lee, 2013). Der TLR4 wird hauptsächlich auf myeloiden Makrophagen und DCs, aber auch auf Mastzellen, NK-Zellen, T- und B-Zellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten exprimiert (Ospelt and Gay, 2010). Der Grund warum TLR4 beide Signalwege (MyD88- und TRIF-vermittelt) aktivieren kann ist, dass es zwischen dem Golgi-Apparat und der Zellmembran translokalisiert wird (Tanimura et al., 2008; Gangloff, 2012). Nach der LPS-Stimulation erfolgt innerhalb von Minuten die Assoziation von Mal mit TLR4, welche die darauffolgende Rekrutierung von MyD88 nach sich zieht. Erst nach einer halben Stunde wird TLR4 weg von der Plasmamembran transloziert, wo TRAM den Adaptor TRIF im Endolysosom rekrutiert. Es wurde vorgeschlagen, dass TLR4 in den jeweiligen zellulären Kompartimenten unterschiedliche Konformationen einnehmen kann, um unterschiedliche Signalwege zu induzieren (Gangloff, 2012). Weiterhin wird CD14 als ein wichtiges intrazelluläres Signalgebungs-Molekül beschrieben, da eine Mutation des CD14 die IRF3-Aktivierung verhindert. Die Endozytose des TLR4 wird mit Hilfe von Dynamin und Clathrin gewährleistet (Kagan et al., 2008). Dynamin ist eine GTPase und Clathrin ist ein „Scaffold“ Protein, das an der Vesikelbildung eine entscheidende Rolle spielt. Nach der Endozytose soll TLR4 auf dessen Ubiquitinierung hin im Lysosom degradiert werden (Husebye et al., 2006).

2.1.3 TNF- α -vermittelte Signaltransduktion

Durch das Zytokin TNF- α („Tumor-Nekrose-Faktor- α “) werden unterschiedliche bedeutsame zelluläre Prozesse, wie z. B. Inflammation, Überleben oder aber auch Apoptose und Nekrose, in Gang gesetzt. Überwiegend ist TNF- α für die pro-inflammatorischen Wirkungen bekannt, kann aber in großen Mengen einen septischen

Schock oder andere Krankheiten auslösen (Aggarwal, 2003). Werden Zellen mit diesem Zytokin stimuliert, so bindet TNF- α an den TNF- α Rezeptor1 (TNFR1) und rekrutiert sodann ein TRADD („TNFR1-associated death domain“)-Protein. Dies resultiert in der Aktivierung des RIP1/TRAF2-Komplexes. RIP1 wird folglich durch TRAF2 polyubiquitiniert (Lysin Rest (K) 63-verlinkt). Dies erleichtert die Rekrutierung vom TAK1/TAB1/TAB2-Komplex und die Aktivierung des p65/RelA NF- κ B Transkriptionsfaktors. NEMO bindet an K63-polyubiquitiniertes RIP1 und stabilisiert es (Festjens et al., 2007; Lo et al., 2009). Dies führt zur Translokation und Aktivierung von NF- κ B. A20 und CYLD („cylindromatosis“) sind negative Regulatoren dieser Aktivierung, da diese nach einer kurzen TNF- α -Stimulationszeit RIP1 und TRAF2 de-ubiquitinieren. An dem RIP1-Protein wird außerdem entschieden, ob die Zelle überlebt oder stirbt (Gentle et al., 2011; Ofengeim and Yuan, 2013). Durch die Anwesenheit des polyubiquitinierten RIP1 werden TRAF2 und cIAPs („cellular inhibitors of apoptosis“) 1 und 2 stabilisiert. Gleichzeitig stabilisiert TRAF2 das durch NF- κ B regulierte cFLIP_L („FLICE-like inhibitory protein“). Das cFLIP_L bindet dann an die Caspase 8 und hemmt die Apoptose der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass in RIP1-defizienten Zellen TRAF2 und cIAP1 proteasomal oder lysosomal degradiert werden (Gentle et al., 2011). Dies führt zur Translokation von p52/RelB-Heterodimeren in den Zellkern. Wird TRAF2 degradiert, kann das cFLIP_L nicht mehr stabilisiert werden, was ebenfalls zur proteasomalen Degradation eines Teils des cFLIP_L führt. Jedoch kann eine Hemmung in der Transkription oder Translation des cFLIP_L zur vollen Aktivierung der Caspase 8 und damit zur Apoptose der Zelle führen. Die Caspase 8 wird zudem durch die Anwesenheit des nicht-ubiquitinierten RIP1 aktiviert (Park et al., 2013). Wird Caspase 8 durch cFLIP_L gehemmt, kann des Weiteren die Kinase-Aktivität von RIP1 die Assoziation mit RIP3 hervorrufen. Dies bewirkt dann die Nekroptose der Zellen, da Necrostatin-1 die TNF- α -vermittelte Nekrose durch die Hemmung der RIP1-Kinase verhindert (Holler et al., 2000; Degterev et al., 2008).

2.1.4 Zytokine

Zytokine unterteilen sich in sechs funktionell unterschiedliche Gruppen von Molekülen, welche nicht nur Immunfunktionen beeinflussen können, sondern auch beispielsweise für die embryonale Entwicklung oder Stammzell-Differenzierung wichtig sind. Die dominierenden Zytokin-vermittelten Effekte werden jedoch in den Bereichen der Entzündung, Immunologie, Atherosklerose und Krebs beschrieben (Dinarello, 2007). Die Zytokine umfassen folgende Gruppen: Interferone, Interleukine, Chemokine, mesenchymale Wachstumsfaktoren, die TNF-Familie und die Adipokine. Erst seit Mitte der 1970er wurden die Zytokine als lösliche Faktoren und Regulatoren der Lymphozyten-Funktionen entdeckt und erforscht. Heute spielen die Zytokine als diagnostische, prognostische und therapeutische Marker in humanen Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grund ist die natürliche Balance und Regulation dieser Zytokine sowie der Zellen, welche diese Zytokine freisetzen, von großem Interesse.

Als Interleukine werden sekretierte Proteine bezeichnet, welche durch ihre Bindung an den entsprechenden Rezeptor eine Art von Kommunikation zwischen Leukozyten induzieren. Diese werden weiterhin in Familien eingeteilt, basierend auf der Sequenzhomologie und der Rezeptor-Ähnlichkeit oder der funktionellen Eigenschaft (Akdis et al., 2011). Wird ein PRR aktiviert, so wird (wie oben beschrieben) eine Signalkaskade ausgelöst und resultiert in der Expression und Freisetzung bestimmter Zytokine, welche dann weitere Zelltypen aktivieren können oder deren Differenzierung in bestimmte Effektorzellen veranlassen. Die aktivierten Zellen können ihrerseits die Pathogene selbst abtöten oder sekretieren Antikörper, die helfen eingedrungene Erreger zu beseitigen.

2.1.4.1 Interleukin-12

IL-12 gehört zusammen mit IL-23, IL-27 und IL-35 zu der IL-12-Familie, da diese entweder den Rezeptor oder eine Untereinheit miteinander teilen. IL-12 ist ein Heterodimer und besteht aus zwei durch Disulfid-Brücken miteinander verbundenen

Untereinheiten (IL-12p35 und IL-12p40) (Gately et al., 1998). IL-12p40 wird mit dem Heterodimer IL-23 geteilt. Die andere Untereinheit von IL-23 ist IL-23p19 (Oppmann et al., 2000). Sowohl im Menschen als auch in der Maus sind p35 und p40 auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Aus diesem Grund werden diese zwei Untereinheiten auch unabhängig voneinander exprimiert. Werden sie in derselben Zelle ko-exprimiert, bilden sie die aktive Form des Heterodimers IL-12 oder auch IL-12p70 (Gubler et al., 1991). IL-12p40 kann als Monomer oder Homodimer in einer hohen Menge basal produziert werden, p35 hingegen wurde als ein streng Stimulus-induzierter limitierender Faktor beschrieben (Snijders et al., 1996). Für die p40-Homodimere wurde zusätzlich eine IL-12p70-antagonisierende Wirkung in der Maus vorgeschlagen (Gillesen et al., 1995). IL-12p70 wird durch aktivierte Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Mikroglia-Zellen, DCs und in geringeren Mengen durch B-Zellen freigesetzt (Akdis et al., 2011). Es induziert dabei die Differenzierung von Th1-Zellen und mittels eines positiven feedback loops die folgende IFN- γ Produktion durch die Th1- und NK-Zellen (Kobayashi et al., 1989; Hsieh et al., 1993). Dieses Interleukin aktiviert indirekt (durch die IFN- γ Sekretion) die antimikrobielle, antiparasitische und antitumorale Aktivität von Makrophagen und impliziert die zytolytische Aktivität von NK-Zellen und Lymphokin-aktivierten Killer-Zellen (Fukao et al., 2001; Trinchieri et al., 2003). Außerdem ist IL-12p70 an der Reifung der DCs beteiligt und trägt zur Differenzierung und Proliferation von T-Zellen bei. Die IL-12p70 Produktion wird durch IL-10, IL-11, IL-13 und Interferone vom Typ I sowie durch einige Arten von G-Protein gekoppelten Rezeptoren inhibiert (D'Andrea et al., 1995; Koch et al., 1996; Hochrein et al., 2000; Aliberti and Sher, 2002). Eine beeinträchtigte Th1-Antwort führt sodann zur höheren Anfälligkeit durch intrazelluläre Pathogene. IL-12p70 bindet an dessen heterodimeren Rezeptor (aus IL-12R β 1 und IL-12R β 2) auf T-Zellen, NK-Zellen, DCs und B-Zelllinien, wobei IL-12R β 1 für die Ligandenbindung essenziell ist (Wu et al., 2000). Nach der Ligandenbindung werden die JAKs ("Janus-Kinasen") durch Transphosphorylierung aktiviert und aktivieren ihrerseits STAT4 ("signal transducers and activators of transcription4") zur Phosphorylierung (Lawless et al., 2000). Dies induziert eine Dimerisierung und Translokation der STAT-Moleküle zum Zellkern, um die Expression bestimmter Gene in Gang zu setzen (Bacon et al., 1995).

2.1.4.2 Interleukin-6

IL-6 ist ein Homodimer bestehend aus 19-26 kDa und wird als Antwort auf unterschiedliche Stimuli (IL-1, IL-17, TNF- α) durch Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen und DCs sekretiert. Während der angeborenen Immunität induziert es die Wanderung und Aktivierung von Leukozyten sowie die Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von T-Zellen (Hurst et al., 2001). IL-6 ist außerdem ein Akute-Phase-Zytokin, welches auch die Produktion weiterer Akute-Phase-Proteine in Hepatozyten veranlasst (Jones et al., 2014). Des Weiteren kann IL-6 (auch als BSF2 bekannt) die Differenzierung von B-Zellen und Produktion von Immunglobulinen beeinflussen (Hirano et al., 1985). IL-6 leitet die Signale durch einen Komplex aus IL-6, dem IL-6-Rezeptor und einer signal-induzierenden weiteren Komponente, dem gp130, weiter. Dabei gibt es zwei Formen des 80 kDa großen Rezeptors: eine Transmembranform und eine lösliche Form (Honda et al., 1992). Wenn IL-6 an die lösliche Rezeptorform gebunden wird, assoziiert es mit gp130 und induziert ein sogenanntes „IL-6 trans-signaling“. Diese lösliche Form soll die IL-6-induzierte Immunität regulieren. Wie bei IL-12, wird auch nach Bindung von IL-6 an den Rezeptor der JAK-STAT-Signalweg induziert. Dieses Zytokin kann außerdem Autoimmunerkrankungen und chronisch inflammatorische Erkrankungen auslösen.

2.1.4.3 Interleukin-23

Das Zytokin IL-23 ist ein Heterodimer und besteht aus den Untereinheiten IL-12p40 und IL-23p19 (Oppmann et al., 2000). Hauptsächlich wird es durch phagozytische Zellen, wie Makrophagen und aktivierte DCs aus peripherem Gewebe produziert. TLR-Liganden, wie LPS, CpG oder Poly I:C induzieren die IL-23 Produktion. Auch andere Faktoren (GM-CSF, Prostaglandin E2 und extrazelluläre Nukleotide) können die IL-23 Sekretion aus APCs verändern (Schnurr et al., 2005). IL-23 wird durch den heterodimeren Rezeptor aus den Untereinheiten IL-12R β 1 und IL-23R an Zielzellen gebunden (Parham et al., 2002). Überwiegend exprimieren aktivierte- und Gedächtnis-T-Zellen diesen Rezeptor, aber auch NK-Zellen, Eosinophile, Monozyten, Makrophagen, DCs und Epithelzellen. Wie durch IL-12p70, wird durch die Stimulation mit IL-23 der

JAK-STAT3-Signalweg aktiviert. IL-23 induziert die IL-17-Produktion und wurde deshalb erstmals als ein Th17-polarisierender Faktor identifiziert (Aggarwal et al., 2003). Jedoch haben neuere Studien gezeigt, dass TGF- β und IL-6 für die Differenzierung naiver T-Zellen in IL-23-Rezeptor positive Th17-Zellen notwendig sind (Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). Physiologisch wird IL-23 konstitutiv in Schleimhäuten des Enddarms durch die Lamina Propria-DCs (LPDCs) exprimiert und wird deshalb in die Entwicklung chronischer Entzündungsreaktionen des Darms implementiert (Becker et al., 2003). Dabei spielen auch die durch IL-23 differenzierten Th17-Zellen eine entscheidende Rolle. Die IL-23/Th17-Achse wurde in chronischen Erkrankungen, wie Colitis (Verma et al., 2013), Morbus Crohn (Tuskey and Behm, 2014), Multiple Sklerose (Esendagli et al., 2013) und Rheumatoide Arthritis (Furst and Emery, 2014) eingehend beschrieben.

2.2 Übersicht der Lipide und ihrer Funktionen

Die am besten bekannte Eigenschaft der Lipide ist, dass diese in unpolaren Flüssigkeiten löslich sind. Sie erfüllen eine Reihe wichtiger Funktionen. Lipide sind hauptsächlich große Energiespeicher, aus anderen wird die Zellmembran aufgebaut und wieder andere sind in der biologischen und zellulären Signalgebung unabdingbare Mediatoren. Tatsächlich lassen sich Lipide in vier Haupt-Gruppen unterteilen: 1. Gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, 2. Glyceride (alle Glycerol-enthaltenden Lipide), 3. Nicht-Glyceride (inklusive Sphingolipiden, Steroiden und Wachsen) und 4. Komplexe Lipide (Lipoproteine und Glykolipide) (College of Engineering & Science-Louisiana Tech University, 2003; Fahy et al., 2009). Im Folgenden wird die Gruppe der Sphingolipide näher erläutert.

2.2.1 Sphingolipide

2.2.1.1 Physiologische Bedeutung der Sphingolipide

Charakteristisch für Sphingolipide ist, dass deren Grundgerüst aus einer Fettsäure und Sphingosin besteht (**Abbildung 3 a**). Bereits im Jahre 1884 hat ein Neurochemiker Sphingosin, das er im Gehirn entdeckte, aufgrund dessen rätselhafter Eigenschaften nach der Sphinx benannt (Merrill et al., 1997). Heute werden die Sphingolipid-Metabolite, Ceramid, Ceramid 1-Phosphat (C1P) und Sphingosin 1-Phosphat (S1P), als bedeutende Effektormoleküle in unter anderem Zellwachstum, Überleben, Migration und Inflammation zunehmend wichtig (Hannun and Obeid, 2008). Durch folgende Etappen wurde die Erforschung der Sphingolipide erst möglich gemacht: 1. Klonierung der Sphingolipid-Komponenten und dadurch Generierung der defizienten Mäuse, 2. Erweiterung der Massenspektrometrischen Analysen und 3. Entwicklung von spezifischen Agonisten und Antagonisten der S1P Rezeptoren (S1PRs) (Maceyka and Spiegel, 2014). Ein Sphingosin-Analog (Fingolimod, FTY720) wird heute schon erfolgreich als Medikament zur Bekämpfung Multipler Sklerose eingesetzt (Brinkmann et al., 2010). Für FTY720 besteht jedoch die Annahme, dass es möglicherweise einigen anderen Zellfunktionen erheblichen Schaden zufügen kann. Beispielsweise wird es intrazellulär akkumuliert (Sensken et al., 2009; Schröder et al., 2015) und ein wichtiges S1P-metabolisierendes Enzym kann durch FTY720 gehemmt werden (Bandhuvula et al., 2005). Es treten weiterhin gravierende Nebeneffekte, wie Bradykardie und Makuladegeneration auf (Brinkmann et al., 2010). Zusätzlich wurde berichtet, dass FTY720 die pro-inflammatorische IL-12p70 Produktion in humanen Monozyten-abstammenden DCs hemmt (Müller et al., 2005). Diese Befunde deuten stark darauf hin, dass trotz des immensen Fortschritts bezüglich der Sphingolipide, diese weiter erforscht werden müssen, um die oben genannten Nebenwirkungen der entwickelten Medikamente auf Basis der Sphingolipide zu vermeiden.

2.2.1.2 Stoffwechsel der Sphingolipide

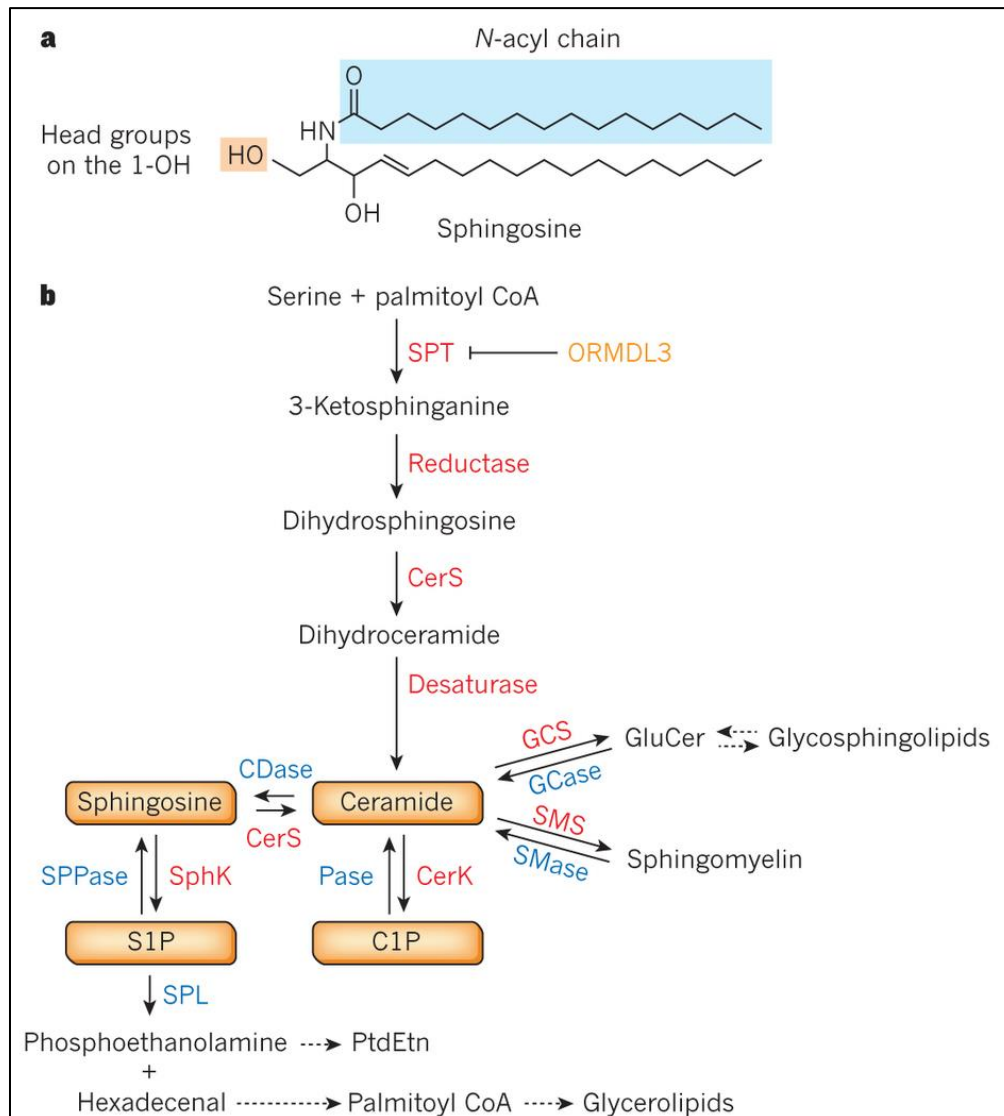


Abbildung 3: Der Sphingolipid-Stoffwechsel (Maceyka and Spiegel, 2014).

SPT=Serin Palmitoyltransferase; CerS=Ceramid-Synthase; CDase=Ceramidase;
 SphK=Sphingosinkinase; SPPase=S1P Phosphatase; SPL=S1P Lyase;
 PtdEtn=Phosphatidylethanolamin; CerK=Ceramidkinase; Pase= Phosphatase; GCS=Glucosylceramid
 Synthase; GCase=Glucosylceramidase; SMase=Sphingomyelinase; SMS=Sphingomyelin Synthase.

Durch die Serin Palmitoyltransferase beginnt im ER die *de novo*-Synthese der Sphingolipide aus Serin und Palmitoyl Co-Enzym A zu 3-Ketosphinganin (**Abbildung 3 b**). Die Aktivität dieses Enzyms ist durch ORMDL3 negativ reguliert (Breslow et al., 2010). 3-Ketosphinganin wird dann zu Dihydro-Sphingosin reduziert, welches weiter

zum Dihydro-Ceramid azetyliert wird. Letzteres wird durch die Desaturase schnell zum Ceramid abgebaut. Vom Ceramid aus werden nun vier unterschiedliche Wege abgeleitet: Zum einen kann es im Golgi Apparat zu Sphingomyelin oder Glucosylceramid (GluCer) metabolisiert werden. Ein anderer Weg schließt die Phosphorylierung von Ceramid zu Ceramid 1-Phosphat (C1P) ein. Und wiederum bei einem anderen und zentralen Weg (oft *salvage*-Weg genannt) wird Ceramid zu Sphingosin deacetyliert. 50% oder mehr des Sphingosins können zurück zum Ceramid wiederverwertet (Hannun and Obeid, 2008) oder aber weiter zu Sphingosin 1-Phosphat (S1P) durch die Sphingosinkinasen 1 und 2 (SphK 1/2) phosphoryliert werden. S1P kann nun entweder durch die S1P Phosphatasen 1 und 2 (SPP 1/2) oder die Lipid Phosphat-Phosphatasen 1 und 2 (LPP 1/2) zurück zu Sphingosin dephosphoryliert werden (Le Stunff et al., 2002; Brindley and Pilquil, 2009). Oder die S1P Lyase (SPL) katalysiert eine irreversible Spaltung von S1P an der C₂-C₃-Bindung zu Phosphoethanolamin und Hexadecenal (Bandhuvula and Saba, 2007; Saba and de la Garza-Rodea, Anabel S, 2013). Da die bioaktiven Wirkungen von S1P sehr unterschiedlich und gravierend ausfallen können, wird dessen intra- und extrazelluläre Menge sowohl durch S1P-generierende (SphK 1/2) als auch durch -metabolisierende Enzyme (SPP 1/2, LPP 1/2 und S1P Lyase) reguliert. Hierbei ist die S1P Lyase das einzige Enzym, welches eine irreversible Spaltung von S1P katalysiert.

2.2.2 Sphingosin 1-Phosphat

Die Konzentrationen von S1P in Blut und Lymphe sind sehr hoch (im mikromolaren Bereich), in den Geweben jedoch gering (Schwab et al., 2005; Hla et al., 2008; Xiong and Hla, 2014). Dies ist wichtig für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität und für die T-Zell-Wanderung. Hauptsächlich sezernieren die Erythrozyten und vaskuläre Endothelzellen das S1P in die Zirkulation, wobei der Transport von S1P aus den Endothelzellen in Mäusen aktiv durch SPNS2 stattfindet (Fukuhara et al., 2012; Hisano et al., 2012). Im Blut ist S1P an ein Albumin oder Apolipoprotein M (Apo M), welches mit HDL („high-density lipoprotein“) assoziiert ist, gebunden (Liu et al., 2012; Liu et al.,

2014). In der Leber steuert Apo M, welches den S1P-Transport zu dem extrazellulären Milieu unterstützt, die S1P Synthese durch Hepatozyten.

S1P ist ein pleiotropischer Lipid-Mediator, welcher eine besondere Rolle in vielen physiologischen Prozessen einnimmt (Alemany et al., 2007; Spiegel and Milstien, 2007). Es erfüllt eine Reihe zellulärer Funktionen, wie Zellwachstum, Überleben (An et al., 2000), Differenzierung und Migration von Lymphozyten (Maeda et al., 2007), Entzündung (Spiegel and Milstien, 2011) sowie auch Regulation der Kanzerogenese (Colié et al., 2009; Tabasinezhad et al., 2013). S1P kann entweder extrazellulär durch die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (S1PR₁ bis S1PR₅) oder intrazellulär als sekundärer „Messenger“ in biologisch aktiven Prozessen fungieren (Van Brocklyn, J R et al., 1998; Payne et al., 2002; Itagaki et al., 2007). Darüber hinaus wurde S1P in der „platelet-derived growth factor“ (PDGF)-induzierten Zellproliferation (Olivera and Spiegel, 1993), in der Inselzell-Viabilität (Lee et al., 2013), Inhibition der Histon-Deacetylasen (HDAC)1/2 (Hait et al., 2009) und Verstärkung des TRAF2/RIP1/NF- κ B Signalweges (Alvarez et al., 2010) beschrieben. Des Weiteren wird das durch SphK1 intrazellulär produzierte S1P in den Extrazellularraum mittels ABC- oder dem SPNS2-Transporter aktiv sezerniert und kann sodann autokrin oder parakrin über die Bindung an S1PR₁ bis S1PR₅ Signale in die Zelle weiterleiten (Rosen and Goetzl, 2005; Spiegel and Milstien, 2011; Nishi et al., 2014). Dieser Mechanismus wird auch als „inside-out signaling“ bezeichnet.

Außer den Erythrozyten, wird S1P durch andere Zellen, wie Blutplättchen, Mastzellen, dendritische Zellen und Makrophagen produziert (Goetzl et al., 2004). Im Unterschied zu den genannten Zellen besitzen Erythrozyten jedoch keine S1P Lyase-Aktivität, welche S1P irreversibel spaltet (Ito et al., 2007). Aus diesem Grund ist im Blut eine mikromolare Konzentration von S1P vorhanden, welche für die Lymphozytenmigration entlang des S1P-Gradienten essenziell ist. Das S1P ist zudem an vielen humanen Erkrankungen beteiligt (Maceyka et al., 2012). Zu diesen Erkrankungen zählen, um einige Beispiele zu nennen, Multiple Sklerose (vermittelt durch S1P/S1PR₁); Rheumatoide Arthritis, welche mit hohen S1P-Spiegeln in der synovialen Flüssigkeit assoziiert ist; entzündliche Darmerkrankungen („Inflammatory bowel disease“, IBD), die ebenfalls mit der

SphK1/S1P/S1PR₁-Achse in Verbindung stehen; oder Asthma, vermittelt durch hohe S1P-Mengen in der Lunge (Maceyka and Spiegel, 2014).

2.2.2.1 Rolle des extrazellulären S1P

Wie oben erwähnt, bindet extrazelluläres S1P an die S1P Rezeptoren 1 bis 5. Diese Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche in ihrer Expression in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen stark variieren können (Chun et al., 2010). Im Allgemeinen werden die S1PRs 1 und 3 hauptsächlich durch Immunzellen, wie DCs, T-zellen und Makrophagen exprimiert (Goetzl et al., 2008). Der am besten untersuchte Mechanismus der Rezeptorwirkung ist für die Lymphozytenmigration von Bedeutung: Nach der Interaktion mit den APCs und der Antigenpräsentation proliferieren die Lymphozyten in den Lymphknoten zu Effektorzellen, welche den S1PR₁ stark überexprimieren. Dadurch wandern die T- und B-Lymphozyten entlang eines S1P Gradienten aus den sekundären lymphatischen Organen und aus dem Thymus in die Zirkulation über, von wo aus diese weiter zum Infektionsherd gelangen können (Kluk and Hla, 2001; Schwab et al., 2005; Cyster and Schwab, 2012). Die Bindung des S1P am Rezeptor resultiert in einer Signalweiterleitung durch die kleinen G-Proteine (G_i, G_s, G_q und G_{12/13}) (Chun et al., 2010). Der Rezeptor selbst wird internalisiert und entweder im Proteasom abgebaut oder aber durch ein Wiederverwertungsprozess zurück zur Plasmamembran geschleust (LaMontagne et al., 2006). Darüber hinaus ist der S1PR₁ notwendig für das Wachstum der Plättchen und ihren Vorgängerzellen im Blut (Hla et al., 2012). In der eigenen Gruppe konnte gezeigt werden, dass durch SphK1, extrazelluläres S1P und S1PR₁ die IL-12p35 Expression und IL-12p70 Produktion in murinen LPS-stimulierten DCs stark reduziert ist (Schröder et al., 2011). Dies konnte erst kürzlich durch eine weitere Studie bestätigt werden (Schaper et al., 2014).

2.2.2.2 Funktionen des intrazellulären S1P

Über die intrazellulären Targets des S1P ist bisher weniger bekannt. Eine wichtige und für diese Arbeit ausschlaggebende Funktion übt es jedoch nach der TNF- α -Aktivierung

aus. Durch TNF- α interagiert das TRAF2-Molekül mit SphK1, welches dann zur Plasmamembran translokalisiert und zur S1P-Produktion aktiviert wird. S1P bindet sodann spezifisch in der Tasche der RING-Domäne des TRAF2-Moleküls und verstärkt als ein Ko-Faktor die E3-Ligase-Aktivität, welche für die spezifische K63-Polyubiquitinierung des RIP1-Moleküls verantwortlich ist (Alvarez et al., 2010). Damit konnte ein Hinweis darauf gegeben werden, dass die TNF- α -vermittelte Signaltransduktion bis hin zur Aktivierung von NF- κ B durch intrazelluläres S1P verstärkt werden kann. Weiterhin wurde berichtet, dass, gefolgt von einer IL-1-Stimulation, cIAP2 und SphK1 mit dem IRF1 einen Komplex bilden (Harikumar et al., 2014). Dies führt zur Aktivierung des IRF1-Moleküls mittels K63-Polyubiquitinierung durch cIAP2, welche wiederum durch S1P verstärkt wurde. Durch das aktivierte IRF1 werden folglich für die sterile Entzündung wichtigen Chemokine (CXCL10 und CCL5) exprimiert. IL-1 spielt zudem eine entscheidende Rolle in Autoimmunerkrankungen. Diese Befunde implizieren zugleich eine durch das intrazelluläre S1P vermittelte anti-apoptotische Wirkung, aufgrund der K63-Polyubiquitinierung des RIP1-Moleküls oder der Aktivierung des anti-apoptotischen cIAP2. Darüber hinaus bindet und hemmt das durch SphK2 produzierte S1P im Zellkern die Expression und Aktivität der Histon-Deacetylasen (HDAC)1/2 (Hait et al., 2009). Dies konnte auch in einer weiteren Studie an S1P Lyase-defizienten MEFs („mouse embryonic fibroblasts“) und resultierender S1P-Akkumulation im Zellkern gezeigt werden (Ihlefeld et al., 2012). Die Hemmung der HDACs wurde in Zusammenhang mit einer Erhöhung der basalen intrazellulären Calcium-Mengen gebracht, da das durch Photolyse generierte S1P unabhängig von den S1P Rezeptoren die intrazelluläre Calcium-Konzentration in HEK-293-, SKNMC- und HepG2-Zellen erhöhte (Ghosh et al., 1994; Meyer Zu Heringdorf, Dagmar et al., 2003). Trotz dessen wurde auch eine rezeptorabhängige Induktion des intrazellulären Calciums in vaskulären glatten Muskulatur-Zellen gefunden (Hopson et al., 2011), was darauf schließen lässt, dass Calcium sowohl durch intra- als auch durch extrazelluläres S1P aus dem ER freigesetzt werden kann. Weiterhin wurde das intrazelluläre S1P in der Aktivierung des BACE1-Enzyms („ β -site APP cleaving enzyme-1“) implementiert (Takasugi et al., 2011). Dies ist ein Enzym zur Produktion des Amyloid- β -Peptids in murinen Neuronen, aufgrund dessen S1P in der Modulation der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle einnimmt. Die Erforschung der Effekte des intrazellulären S1P nimmt

in den letzten Jahren massiv zu, beispielsweise auch in der Modulation der Signaltransduktion in humanen Lungen-Endothelzellen unabhängig von S1P Rezeptoren (Usatyuk et al., 2011).

2.2.3 S1P Lyase

Die S1P Lyase, welche am ER integriert in der Zelle vorliegt, ist evolutionär hochkonserviert und wird ubiquitär in den Säugerzellen exprimiert (Van Veldhoven, P P, 2000). Es degradiert S1P irreversibel, weshalb es als ein vorherrschender Regulator der S1P-Menge innerhalb und außerhalb der Zelle angesehen wird. Die S1P Lyase ist Pyridoxal-5'-Phosphat abhängig und dessen Lysin Rest-353, welches eine interne Schiff'sche Base mit dem Pyridoxal-5'-Phosphat ausbildet, ist an der Spaltung des S1P in Phosphoethanolamin und Hexadecenal maßgeblich beteiligt (Ikeda et al., 2004b). Die S1P Lyase ist in der Immunologie von essenzieller Bedeutung und ist zugleich ein grundlegender Modulator inflammatorischer Prozesse. Wird die S1P Lyase gehemmt, so kommt es zur Lymphopenie aufgrund von gehemmter Lymphozytenmigration. In diesem Fall ist das Gleichgewicht der S1P-Konzentrationen gestört, da das S1P nicht mehr abgebaut wird. Folglich können die Lymphozyten nicht mehr entlang des S1P-Gradienten aus dem sekundären lymphatischen Gewebe und Thymus in die Blutbahn wandern (Schwab et al., 2005). Bei einem konstitutiven „knock-out“ der S1P Lyase in Mäusen überleben diese maximal 3 Wochen, da sowohl die Sphingolipid-Balance als auch die Entwicklung des Thymus massiv gestört sind (Weber et al., 2009). Außerdem sind in diesen Mäusen die Ceramid-Mengen stark erhöht, so dass dies zu einer verstärkten Apoptose der Thymocyten führt. Des Weiteren werden in den S1P Lyase-defizienten Mäusen erhöhte Mengen an S1P im Gewebe und Serum gemessen. Die Neutrophilen im Blut sind stark erhöht, die Zahl der Lymphozyten ist dagegen sehr niedrig (Vogel et al., 2009; Bektas et al., 2010; Allende et al., 2011). Nach einer partiellen Wiederherstellung der S1P Lyase-Aktivität in den S1P Lyase-defizienten (*sgpl1^{-/-}*) Mäusen durch ein Allel der humanen S1P Lyase, wurde weniger als 10% der normalen S1P Lyase-Aktivität gemessen. Dies war zwar nicht ausreichend, um eine normale T-Zellentwicklung wiederherzustellen, aber um die Mäuse von letalen, nicht-

lymphoiden Läsionen zu schützen (Vogel et al., 2009). Aus diesen Gründen wurde in vielen Studien eine eher partielle Inhibition der S1P Lyase als Therapeutikum vorgeschlagen (Bagdanoff et al., 2009; Vogel et al., 2009; Zhao et al., 2011; Billich et al., 2013; Kleinjan et al., 2013).

Weiterhin wurde die S1P Lyase in der Signalweiterleitung der Interferone vom Typ I während einer Virusinfektion impliziert (Seo et al., 2010). Dabei führte eine Überexpression der S1P Lyase zur Blockade der Influenza-Virus-Replikation über den JAK/STAT-Weg. Der Virus-induzierte Zelltod wurde in diesen Zellen durch verminderte Produktion des pro-apoptotischen Proteins Bax inhibiert. Die S1P Lyase ist also ein wesentlicher Bestandteil der protektiven Funktion gegen Infektionen durch einen Virus während angeborener Immunantwort. Trotz dessen wurde die Regulation der S1P Lyase während akuter und chronischer Entzündung bisher nur wenig untersucht.

2.2.4 Die Sphingosinkinasen

Wenngleich beide Sphingosinkinasen (1 und 2) S1P durch Phosphorylierung von Sphingosin produzieren können, unterschieden diese sich maßgeblich in der Spezifität und sowohl in der gewebespezifischen als auch in der zellulären Lokalisation (Spiegel and Milstien, 2007). Beispielsweise spielen die beiden Enzyme gegensätzliche Rollen in der immunmodulatorischen Arthritis (Lai et al., 2009). Beide Enzyme sind aber notwendig um TNF- α aus Mastzellen effizient zu sezernieren (Oskeritzian et al., 2008). SphK1^{-/-}/SphK2^{-/-} Doppelknockout-Mäuse sind schon während der embryonalen Entwicklung letal, jedoch können die einfach defizienten Tiere ohne auffälligen Phänotyp geboren werden (Alemany et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass beide Enzyme einander möglicherweise kompensieren können. Da S1P in vielen Erkrankungen, wie oben beschrieben, implementiert wird, sind auch die Sphingosinkinasen, vorrangig aber SphK1, maßgeblich an diesen Erkrankungen beteiligt.

Es wurde gezeigt, dass nach einer frühen Aktivierung der Zellen das Enzym SphK1, welches sich nah an der Plasmamembran befindet, aktiviert wird, um S1P zu produzieren (Cuvillier et al., 1996; Wadgaonkar et al., 2009). Nach seiner Produktion

wird S1P aktiv aus der Zelle befördert und kann sogleich durch das „inside-out signaling“ an dessen Rezeptoren weitere Signalkaskaden aktivieren (Olivera et al., 2003). Diese Translokation der SphK1 induziert dessen onkogenen Effekte (Pitson et al., 2005). Des Weiteren wird SphK1 in der Proliferation der Adenoma-Zellen impliziert (Kohno et al., 2006). SphK1 wird durch eine Bandbreite an Mediatoren, wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, einigen Antigenen und Calciumkaskaden aktiviert (Cuvillier et al., 1996; Wadgaonkar et al., 2009). Dieses Enzym ist außerdem entscheidend an der Degranulation der Mastzellen beteiligt (Melendez, 2008; Pushparaj et al., 2009). Exprimiert wird SphK1 vorwiegend in der Lunge, Milz und Leber (Wadgaonkar et al., 2009).

SphK2 hat ebenfalls dieselben fünf evolutionär konservierten Domänen wie SphK1, jedoch unterscheidet SphK2 sich von SphK1 in der zentralen Region und hat auch einen längeren Aminoterminal (Spiegel and Milstien, 2007). Die unterschiedlichen Funktionen der beiden Enzyme können aus der unterschiedlichen zellulären Lokalisation resultieren: SphK2 befindet sich im Zellkern und im endoplasmatischen Retikulum, während SphK1 im Zytoplasma, meistens nah an der Plasmamembran, lokalisiert ist. Von SphK2-spezifischen Effekten ist derzeit relativ wenig bekannt. Die Herunterregulation von SphK2 hemmt das Wachstum und verstärkt die Apoptose von Glioma-Zellen (Liu et al., 2003; Van Brocklyn, James R et al., 2005). Zusätzlich induziert SphK2 die Ceramid-Bildung, während SphK1 den gegenteiligen Effekt zeigt (Maceyka et al., 2005). SphK2 wird hauptsächlich in Gehirn, Herz und Niere exprimiert (Billich et al., 2003). Im Zusammenhang mit S1P im Zellkern wurde gezeigt, dass SphK2 an der Histonmodifikation beteiligt ist, was in der Produktion des Kinaseinhibitors p21 resultiert (Hait et al., 2009). Fingolimod (FTY720), das in der Klinik gegen Multiple Sklerose eingesetzt wird, wird präferentiell durch SphK2 zu FTY720-Phosphat umgesetzt, welches sodann aus der Zelle transportiert wird, um an die S1P Rezeptoren (1, 3 bis 5) zu binden (Billich et al., 2003; Vessey et al., 2013). Folglich werden die Rezeptoren internalisiert und degradiert, wodurch pathogene autoreaktive T-Zellen im Lymphknoten verbleiben.

2.2.5 Sphingolipide in der Apoptose

Die Sphingolipid-Metabolite Ceramid, Sphingosin und S1P spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation des zellulären Überlebens und Sterbens (Maceyka et al., 2002). In der Zelle wird ein Gleichgewicht zwischen den pro-apoptotischen Metaboliten Ceramid und Sphingosin und dem anti-apoptotischen S1P gehalten („sphingolipid rheostat“), da diese ineinander reversibel konvertiert werden können. Darüber hinaus signalisiert auch die SphK1/S1P/ S1PR₁-Achse das Überleben der Zelle (Limaye et al., 2005). Dabei wird das Überleben der Endothelzellen durch Überexpression von SphK1 und die PI-3K (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase)/Protein Kinase B (Akt/PKB) vermittelt. Es existieren jedoch auch kontroverse Publikationen bezüglich der anti-apoptotischen Wirkungen des S1P (Chipuk et al., 2012). Hierbei wurde das intrazelluläre S1P und Hexadecenal in der BAK/BAX-Aktivierung und folglich in der Beeinflussung der mitochondrialen Permeabilität und Apoptose impliziert.

Ceramid hat durch seine Eigenschaften Apoptose zu induzieren eine große Aufmerksamkeit erregt. Dessen Produktion wird durch Zytokine, Antigene, anti-karzinogene Medikamente oder durch Stress eingeleitet (Hannun and Luberto, 2000). Durch einige dieser Stimulanzen wird in der Tat die Hydrolyse des Sphingomyelins induziert, was zur Folge hat, dass Ceramid in den Zellen akkumuliert. Ceramid wird durch die Ceramidase weiter zu Sphingosin abgebaut und Letzteres wird ebenfalls in der Zell-Apoptose impliziert. Werden Zellen mit Sphingosin behandelt, so wird dadurch Apoptose induziert (Cuvillier, 2002). Ein gutes Beispiel dafür wurde schon im Jahre 1994 publiziert (Ohta et al., 1994): Die Stimulation humaner Neutrophiler Zellen mit TNF- α induzierte eine Erhöhung von Ceramid und Sphingosin schon nach 60 min Behandlung. Dabei stiegen zunächst die Ceramid-Mengen an, gefolgt von Sphingosin, welches bis zu 10 μ M zellulärer Konzentration erreichte. Dies implizierte, dass die hohen Sphingosin-Mengen während der Apoptose aus dem Ceramid generiert werden können. Die Induktion der Apoptose kann durch eine Reihe von Sphingosin-vermittelten Effekten beobachtet werden (Cuvillier, 2002). Darunter wurde auch beschrieben, dass durch Sphingosin die basale und stimulierte Akt-Kinase Aktivität in Hepatoma-Zellen inhibiert wird (Chang et al., 2001). Eine Überexpression von Akt konnte dagegen die Sphingosin-vermittelte Apoptose und Caspase-Aktivierung abmildern.

2.3 Ziele dieser Doktorarbeit

In den letzten Jahren wurde bezüglich der Aufklärung der Sphingolipide in der Immunologie ein großer Fortschritt sichtbar. Im Vordergrund steht die Erforschung der vielfältigen S1P-Effekte in unterschiedlichen biologischen Prozessen. Da die Produktion dieses Moleküls jedoch von dessen unterschiedlicher Lokalisation sowie von generierenden und degradierenden Enzymen abhängig ist, sind Untersuchungen der S1P-Funktionen schwierig und in mancher Hinsicht kontrovers. Beispielsweise können S1P sowohl pro- als auch anti-entzündliche bzw. -apoptotische Funktionen zugeordnet werden. Weniger ist über dessen degradierendes Enzym, die S1P Lyase, bekannt. In der Erforschung der S1P-Effekte wird dieses Enzym oft blockiert oder „ausgeknockt“, um die zelluläre Wirkung des S1P nach dessen Akkumulation zu untersuchen. Wie die S1P Lyase jedoch unter „normalen“ Bedingungen und unter einer klassischen Entzündung in Zellen des Immunsystems reguliert wird, ist bisher wenig erforscht worden. Aus diesem Grund sollte eine gründliche Analyse der S1P Lyase-Expression nach Stimulation der murinen DCs mit unterschiedlichen TLR-Liganden untersucht werden. Das Ziel war auch die S1P Lyase-Regulation nach einer zeitabhängigen DC-Aktivierung zu analysieren, um darüber Aufschluss zu geben, ob diese sich im Übergang zur chronischen Entzündung ändert. Da die S1P Lyase jedoch nicht das einzige S1P-konzentrationsbestimmende Enzym ist, sollten auch andere S1P-generierende und -metabolisierende Enzyme auf dessen Expression nach zeitabhängiger Stimulation der DCs hin untersucht werden. Des Weiteren stand ein konditionales Mausmodell zur Ausschaltung der S1P Lyase zur Verfügung, welches in murinen DCs sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* erprobt werden konnte, um zukünftig intrazelluläre S1P-Effekte in DCs untersuchen zu können. Da das intrazelluläre S1P nach einer TNF- α -Stimulation in dessen pro-entzündliche Modulation impliziert wurde, sollten die murinen DCs nach der Aktivierung durch beides, TNF- α und LPS, auf pro-entzündliche Zytokine hin untersucht und gegebenenfalls eine mögliche Interaktion zwischen den TRAF2- und TRAF6- Signalmolekülen analysiert werden. Darüber hinaus sollten S1P-neutralisierende Spiegelmer, welche das extrazelluläre S1P abfangen und somit den hemmenden Effekt auf die IL-12p70 Produktion aufheben, als ein nützliches Werkzeug erprobt und angewandt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Mauslinien

3.1.1 Der WT-C57BL/6-Stamm

Der WT-C57BL/6 Stamm wurde als Kontrolle verwendet. Diese Mauslinie entstand aus einer Inzucht des Stammes C57BL. Dies resultiert in genetischer Ähnlichkeit unter den Mäusen und erlaubt ein einfaches Züchten. Man nutzt diese Tiere auch in Gendefizienz-Studien als genetischen Hintergrund. Außerdem fällt die Immunantwort verstärkt in Richtung einer Th1-spezifischen Immunantwort aus, was durch eine leichtere Aktivierung von Typ 1 Makrophagen charakterisiert worden ist (Mills et al., 2000). Des Weiteren sind diese Mäuse resistent gegen manche intrazelluläre Pathogene, wie z. B. *Leishmania major*. Für diese Arbeit wurden die Mäuse von der Firma Janvier (Saint Berthevin Cedex, Frankreich) gekauft und bis zur Versuchsdurchführung in der lokalen zentralen Forschungseinrichtung unter spezifisch pathogen freien Bedingungen gehalten.

3.1.2 SphK1^{-/-}-Mäuse

Die Sphingosinkinase-defizienten Tiere wurden durch genOway (Lyon, Frankreich) nach Pushparaj et al. hergestellt (Pushparaj et al., 2009). Die Mäuse wurden auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt (in mehr als zehn Generationen) und freundlicherweise von Prof. Dr. Andrea Huwiler und Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter bereitgestellt. Für die Experimente wurden diese Tiere bis zum Versuchsbeginn in der lokalen zentralen Forschungseinrichtung unter spezifisch pathogen freien Bedingungen gehalten.

3.1.3 WT- und SphK1^{-/-}-Mäuse auf BALB/c-Hintergrund

Die WT- und SphK1-defizienten Mäuse auf BALB/c-Hintergrund wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Scholich bereitgestellt. Bis zur Versuchsdurchführung

wurden diese Mäuse in der lokalen zentralen Forschungseinrichtung unter spezifisch pathogen freien Bedingungen gehalten.

3.1.4 Tamoxifen induzierbare Kontroll- und S1P Lyase-defiziente Mäuse

Die homozygoten $SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-}$ - und die heterozygoten $SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}$ -Mauslinien wurden zu Versuchszecken freundlicherweise von Novartis zur Verfügung gestellt. Der Prozess zur Herstellung dieser Mäuse wurde wie folgt beschrieben: Für die homologe Rekombination wurde zunächst ein targetierender pRay2LoxP2Frt-Vektor mit einer Neomycin-Expressions-Kassette entwickelt. Dieser Vektor beinhaltete die genomische DNA des Introns 7, Exons 8, Introns 8, Exons 9 und eines Teils des Introns 9 des S1P Lyase-Gens. Zusätzlich war Exon 8 durch zwei LoxP-Elemente flankiert. Dies erleichterte das Ausschneiden dieses Exons nach der Verpaarung mit den Cre-Mauslinien. Die Vektoren wurden in C57BL/6 embryonische Stammzellen transfiziert (Ledermann and Bürki, 1991) und neomycin-resistente Klone konnten dann durch eine PCR identifiziert werden. Eine Überprüfung einer mehrfachen Integration des Vektors fand zusätzlich durch Southern Blot mit Hilfe einer neomycin-spezifischen Sonde statt. Ausgewählte embryonische Stammzellen wurden darauf in BALB/c-Blastocyten injiziert und die chimären Mäuse mit C57BL/6-Weibchen gezüchtet. Es ergab sich eine F1 Generation von heterozygoten C57BL/6 Inzucht-Mäusen. Daraufhin wurde die FRT-flankierte Neomycin-Kassette durch eine weitere Kreuzung mit einem FLP „deleter“-Stamm entfernt. Diese $SPL^{Flox/Flox}$ -Mäuse wurden zusätzlich mit einer C57BL/6 Cre „deleter“-Linie (Schwenk et al., 1995) gekreuzt, um S1P Lyase-defiziente Tiere zu erhalten.

Für die Tamoxifen-induzierbare S1P Lyase-Defizienz wurden die $SPL^{Flox/Flox}$ -Mäuse mit der B6.C actb-Cre-ER^{T2TM}-knock-in-Mauslinie gekreuzt. Es entstanden zwei Stämme, welche als die homozygoten $SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-}$ - und die heterozygoten $SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}$ -Mauslinien bezeichnet und bis zum Versuchsbeginn in der lokalen zentralen Forschungseinrichtung unter spezifischen Bedingungen gehalten wurden.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung muriner primärer Zellen aus der Milz

Die Maus wurde nach Betäubung mit Isofluran mittels zervikaler Dislokation getötet und in eine Incidinlösung getaucht. Haut und Bauchfell der fixierten Maus wurden bis zum Brustbein aufgeschnitten, die Milz wurde vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette abgelöst und im serumfreien Medium gelagert. Durch Potter und Pistill konnte die Milz dann homogenisiert werden. Verbliebene Gewebestücke wurden mittels Filter (70 μ M; BD Falcon, Belgien) entfernt. Nach einer Zentrifugation bei 400 g für 10 min bei RT wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 2 ml ACK-Puffer zur Lyse von Erythrozyten für 3 min bei 37°C resuspendiert. Um die Milzzellen jedoch nicht zu beschädigen, wurden sogleich 5 ml Medium mit 5% FCS (Fetales Kälberserum) zugegeben und wieder bei 400 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml serumfreien Medium wurden die pelletierten Zellen in 20 ml Medium mit 5% FCS aufgenommen, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in der Konzentration von 4×10^6 Zellen / ml in 5 ml auf T25-Zellkulturflaschen verteilt.

ACK Puffer: 0,15 M NH_4Cl
 10 mM KHCO_3
 0,1 mM Na_2EDTA

Milzzellmedium: Iscove`s Medium
 2 mM L-Glutamin
 100 IU/ml Penicillin
 100 μ g/ml Streptomycin
 1 mM Natrium Pyruvat
 100 μ M nicht essenzielle Aminosäuren
 50 μ M β -Mercaptoethanol

3.2.2 Isolierung und Differenzierung von murinen primären Zellen aus dem Knochenmark

Die Knochenmarkszellen (KMZ) wurden aus Femur und Tibia isoliert. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran betäubt, mittels zervikaler Dislokation getötet und in eine Incidinlösung getaucht. Danach wurde die Maus vom Bauch bis zu den Hinterläufen gehäutet und die Hinterbeine vom Körper abgetrennt. Es erfolgte die Separation der beiden Knochen voneinander durch Überstreckung und Freilegung der Knochen von Muskelgewebe und Fell sowie eine kurze Desinfektion der freigelegten Knochen in 80% Ethanol. Danach wurden die Knochen im PBS gelagert. Die Enden der Knochen wurden abgeschnitten und mit PBS in ein sauberes Falcontube mittels einer 26G Kanüle und 10 ml Spritze durchgespült. Nach der Zentrifugation bei 230 g_n (230fache mittlere Erdbeschleunigung) für 6 min wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 3 ml ACK-Puffer pro Maus für 1 min bei RT lysiert. Die Reaktion wurde anschließend durch FCS-haltiges Medium abgestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im KM-Medium mit 10% FCS aufgenommen und die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Daraufhin wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml in 25 bis 35 ml des FCS-haltigen Mediums zusammen mit 40 ng/ml GM-CSF in T175-Zellkulturflaschen gegeben. Die Zellen sollten zunächst für 4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert werden. Am vierten Tag wurden 75% des FCS-haltigen Mediums ausgetauscht und wieder entsprechend des Gesamtvolumens 40 ng/ml GM-CSF zugegeben, wonach die Zellen für die nächsten drei Tage ausdifferenzieren sollten.

<u>KM-Medium:</u>	RPMI 1640 Glutamax
	1 mM Natrium Pyruvat
	10 mM HEPES
	100 IU/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	50 µM β-Mercaptoethanol

3.2.3 Kultivierung und Stimulation der inkubierten Zellen aus Milz und KM

Die primären Milzzellen wurden für 20 h im Medium mit 5% FCS bei 37°C und 5% CO₂ gelassen, dann das Medium abgenommen und die Zellen abzentrifugiert. Daraufhin wurden zu dem Zellpellet wieder 5 ml des serumfreien Mediums pipettiert und die resuspendierte Zellsuspension in die Zellkulturflaschen zurückgegeben. Dadurch, dass FCS im Medium nicht vorhanden war, sollte eine auf den Stimulus hin spezifischere und ausgeprägte Zytokinproduktion erfolgen. Die Zellen wurden dann zunächst für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und danach für 18 h stimuliert oder unbehandelt gelassen.

Die adhärenenten, primären und ausdifferenzierten KM-DCs wurden zunächst direkt im vorhandenen Medium von der Zellkulturflasche abgeschabt und die Zellsuspension bei 230 g_n für 6 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden ist, wurde das Zellpellet im KM-Medium ohne FCS-Zusatz resuspendiert und die Zellen mit Hilfe eines „Automatic Cell Counter“ (Bio-Rad) gezählt. Die Zellen wurden auf 1×10^6 Zellen / ml eingestellt und je nach Versuchsaufbau in 6-, 12- oder 24-Lochplatten mit 2×10^6 Zellen / 2 ml, 1×10^6 Zellen / ml oder $0,5 \times 10^6$ Zellen / 0,5 ml in jedes Loch („Well“) der Platten gegeben. Für andere Experimente (vorwiegend zur Proteinisolation und Hexadecenal-Bestimmung) sollten 5×10^6 Zellen / 5 ml in T25-Zellkulturflaschen inkubiert werden. Nachdem alle Zellen ausgesäht worden waren, sollten diese bei 37°C und 5% CO₂ für 1 h ruhen gelassen werden bis sie mit den in der **Tabelle 1** angegebenen Substanzen für unterschiedliche Zeiten (siehe Legenden der Abbildungen) inkubiert wurden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für die Zytokinmessung, Lipid-Extraktion und Hexadecenal-Bestimmung mittels Trypan Blau-Färbung gezählt. Hierfür wurden die Zellen von den Lochplatten oder T25-Zellkulturflaschen abgeschabt und 10 µl dieser Zellsuspension mit 10 µl Trypan Blau-Lösung vermischt. Innerhalb von 10 min hat man die Gesamt- und Lebendzellzahl mittels des „Automatic Cell Counter“ (Bio-Rad) bestimmt.

Tabelle 1: Substanzen bzw. TLR-Liganden, welche zu den Zellen gegeben worden sind.

Substanz / Ligand	Evtl. TLR	Hersteller	Konzentration
m TNF- α		PeproTech (#315-01A)	10 / 100 ng/ml
m IL-1 β		PeproTech (#211-11B)	10 ng/ml
IFN- γ		PeproTech	1 - 10 ng/ml
Staurosporin		LC Laboratories (#S-9300)	2 / 10 μ M
Pam 3CSK4	1/2	InvivoGen (#tlrl-pms)	0,1 - 2 μ g/ml
Poly I:C	3	InvivoGen (#tlrl-pic)	25 / 50 μ g/ml
LPS (<i>E. coli</i> O127:B89)	2/4	Sigma Aldrich (#L3129)	0,5 - 5000 ng/ml
Flagellin	5	InvivoGen (#tlrl-stfla)	0,05 - 10 μ g/ml
Pam 2CSK4	2/6	InvivoGen (#tlrl-pam2)	1 - 200 ng/ml
R848	7/8	3M Pharmaceuticals (#3M-007)	0,03 - 9,43 μ g/ml
CpG ODN 2216	9	InvivoGen (#tlrl-hodna-1)	2,41 - 19,25 μ g/ml
S1P		Cayman (#62570)	0,01 - 1000 μ M
4-Deoxypyridoxin		Sigma-Aldrich (#D0501)	0,5 - 6 mM
NOX-S93		NOXXON	0,01 - 5 μ M
revNOX-S93		NOXXON	0,01 - 5 μ M
(Z)-4-Hydroxytamoxifen		Sigma-Aldrich (#H7904)	1 μ M
Tamoxifen (für <i>in vivo</i>)		Sigma-Aldrich (#T5648)	40 mg/kg

3.2.4 Einkonzentrieren der Überstände für Zytokin-Konzentrationsmessungen

Nach Stimulation der Milzzellen wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet von Überständen getrennt. Die Überstände sollten dann mittels 10 kD Centriprep Säulen (Millipore, Schwalbach, Deutschland) für 45 min bei 4°C und 2000 g nach Herstellerangaben aufkonzentriert werden. Vor dem ersten Gebrauch wurden die Säulen zunächst für 8 min bei 2000 g mit H₂O equilibriert.

3.2.5 Proteinisolation aus Gesamtzelllysat stimulierter muriner KM-DCs

Die stimulierten KM-DCs (2 / 5 x 10⁶ Zellen pro 2 / 5 ml) wurden je Loch („Well“) oder T25-Zellkulturflasche abgeschabt und bei RT mit 230 g_n für 6 min abzentrifugiert.

Danach wurde der Überstand vom Zellpellet getrennt und das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin in 100 µl eines frisch zubereiteten Proteinisolationssuffers resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach den 10 min wurden 6,7 µl 10 % NP-40 pro Probe zugegeben, resuspendiert und für 10 min bei 4 °C und 13000 g_n zentrifugiert. Im Überstand befanden sich Membran- und Zytoplasmaproteine, welche auf die darin enthaltenen Proteinmengen untersucht wurden. Bis zu dieser Analyse wurden die Überstände bei -80°C gelagert.

Proteinisolationssuffer: 10 mM HEPES-KOH pH 8,0
 10 mM KCl
 0,1 mM EDTA
 0,1 mM EGTA
 25 x Proteinaseinhibitorcocktail
 0,5 mM NaF
 1 mM Na₃VO₄

3.2.6 Bestimmung der Konzentration isolierter Proteine

Die Gesamtproteinkonzentration aus stimulierten murinen KM-DCs wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA) „Protein Assay Reagent“ (Pierce/ThermoScientific) ermittelt. Durch das Zugabe von BCA schlägt der blaue, durch eine Biuret-Reaktion gebildete Komplex in einen violetten Komplex um. Je größer die Gesamtproteinkonzentration ist, desto dunkler ist dieser violette Komplex ausgeprägt, dessen Absorption man bei einer Wellenlänge von 562 nm messen kann. Zunächst wurden manche Proben in einer Verdünnungsreihe aufgetragen, um die passende Verdünnungsstufe zu ermitteln. Daraufhin wurden alle Proben 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und als Doppelwerte in eine 96-Lochplatte pipettiert. Zusammen mit den Reagenzien wurde die Platte bei 37°C für 30 min inkubiert und im Photometer SpectraMax M5^e (Molecular Devices) gemessen. Auch eine Albumin-Kontrolle wird mitgemessen. Auf diese Weise lässt sich die Proteinkonzentration relativ zu der Albumin-Standardkurve berechnen.

3.2.7 Lipid-Extraktion und Messung der Sphingolipide mittels LC-MS/MS

Für die Lipid-Extraktion wurden 2×10^6 Zellen / 2 ml für unterschiedliche Zeiten stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen gezählt und bei $230 g_n$ für 6 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 μ l Methanol aufgenommen, resuspendiert und konnte bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C aufbewahrt werden. Für die Extraktion wurden zunächst 20 μ l eines internen Standards (500 ng/ml C17-Cer, 500 ng/ml Sph-d7, 500 ng/ml S1P-d7 and 500 ng/ml Saph-d7; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) und 35 μ l einer 1 M HCl-Lösung zu jeder Probe gegeben, gemischt und 1 h bei 4°C inkubiert. Weiterhin wurden 480 μ l Salzlösung und 600 μ l Chloroform hinzupipettiert, bis zu einer min gevortexet und anschließend bei $13000 g_n$ für 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde in ein sauberes Gefäß überführt. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 600 μ l Chloroform extrahiert. Die beiden Extraktionen konnten vereint und über Nacht bei -20°C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 45°C unter Stickstoffbegasung abgedampft, in 100 μ l Methanol aufgenommen und für 15 sec gemischt. Auch wurde eine Standardreihe (10 μ l) für die Auswertung der Lipid-Werte zusammen mit dem internen Standard (20 μ l) und Methanol (70 μ l) pipettiert. Als Kontrollen dienten entweder 80 μ l Methanol mit 20 μ l Internem Standard oder 100 μ l Methanol. Von jeder Probe wurden 50 μ l in Glasgefäße überführt. Die Messung fand an einem LC-MS/MS-System durch die freundliche Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Geißlinger statt: Für die chromatographische Auftrennung wurde eine Luna C18-Säule (150 mm x 2 mm ID, 5 μ m Partikelgröße, 100 Å Porengröße; Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Es wurden zwei mobile Phasen angefertigt: Die erste Phase (A) bestand aus H_2O :Ameisensäure (100:0.1, v/v) und die zweite (B) bestand aus Acetonitril:Tetrahydrofuran:Ameisensäure (50:50:0.1, v/v/v). Für die Auftrennung wurde eine Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min gewählt. 10 μ l jeder Probe wurde in das System injiziert und die allgemeine Dauer des Durchgangs für jede Probe betrug 16 min: Die anfängliche Puffer-Zusammensetzung (60 % von (A)/40 % von (B)) wurde für 0,6 min gehalten und dann innerhalb von 3,9 min wurde dies linear gewechselt zu 0 % (A)/100 % (B), welche dann für 6,5 min gehalten wurde. Danach fand innerhalb von 0,5 min wiederholt ein linearer Wechsel statt zu 60% (A)/40 % (B) und dies wurde für weitere 4,5 min gehalten. Die MS/MS-Analyse wurde an einem API4000

dreifachen Quadrupol-System mit einer „Turbo Ion Spray“ Quelle („Electrospray Ionization“; Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Zwei Vorläufer-zu-Produkt Ionenübergänge (m/z Transitionen) mit einer Haltezeit von 50 ms wurden aufgenommen: eine für die Quantität ($380,2 \rightarrow 264,2$) und die andere für die Qualität ($380,2 \rightarrow 82,1$), um die falsch positiven Ergebnisse auszuschließen. Die Auswertung wurde mittels der Analyst Software 1,5 (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Die Linearität der Kalibrierungskurve wurde von 0,15 zu 250 ng/ml überprüft. Der Koeffizient der Korrelation lag bei 0,99 und Variationen in der Präzision waren weniger als 15% über dem Kalibrierungsbereich.

Salzlösung: 0,74% KCl
 0,04% CaCl_2
 0,034% MgCl_2

3.2.8 Bestimmung der S1P Lyase-Aktivität durch die (2E)-Hexadecenal-Menge

Nach der Stimulation von anfänglich 5×10^6 Zellen / 5 ml wurden diese von T25-Zellkulturflaschen auf Eis abgeschabt, gezählt und bei $230 g_n$ für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und die Zellpellets sollten einmal mit PBS gewaschen werden. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellpellets auf Trockeneis in ein Labor von Prof. Dr. Burkhard Kleuser per Express-Kurier geschickt, wo in freundlicher Kooperation die Menge des (2E)-Hexadecenals durch eine spezifisch etablierte Methode nachgewiesen werden konnte: Diese Methode lehnt sich stark an Berdyshev *et al.* an (Berdyshev *et al.*, 2011b). Die Zellpellets sollten zunächst in 300 μl Lysepuffer für 1 h auf Eis geschüttelt werden. Dann wurde der Protein-Gehalt mittels der Bradford-Methode bestimmt und die Proben (Zelllysate) bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Diese Lagerung hatte keine Beeinträchtigung der S1P Lyase-Aktivität zur Folge. Für die Messung sollten zunächst 40 μl des 1 mM S1P in Methanol in 12 ml-Glasröhrchen vorgelegt und abgedampft werden. Es folgte die Zugabe von 25 μl Aqua dest. mit 1% Triton X-100, welche für 15 min im eisgekühlten Ultraschallbad homogenisiert wurden. Danach wurden 15 μl Aqua dest, 400 μl Reaktionspuffer und 60 μl von dem auf 5 μg Proteingehalt eingestellten Zelllysate hinzupipettiert und bei 37°C

für 30 min inkubiert. Die Reaktionen wurden auf Eis abgestoppt. Anschließend wurden Aldehyde aus den Proben extrahiert (modifiziert nach Dole *et al.*) (DOLE and MEINERTZ, 1960): 1,5 ml Dole-Reagenz (Hexan:Isopropanol 1:4), 10 µL des internen Standards (66,67 µM 12:1-CHO in ACN \triangleq 200 pmol / 75 µl Injektion oder 200 µM 15:0-CHO in ACN \triangleq 600 pmol / 75 µl Injektion), 1 ml LC-MS grade Wasser und 1,5 ml n-Hexan wurden schnell zugegeben und für 1 min gevortext. Dann wurde bei 2729 g_n und 4 °C für 10 min zentrifugiert und die organische Phase mittels Glaspasteurpipetten in neue Glasgefäße überführt. Nach wiederholter Zugabe von 1,5 ml n-Hexan wurde nochmals extrahiert. Diese Extraktionen sollten in der SpeedVac abgedampft werden gefolgt von der Zugabe von 250 µl des Derivatisierungsgemisches (2-Diphenylacetyl-1,3-indandion-1-hydrazon (DAIH) in ACN) bei 4°C für 15 min nach Lüth *et al.* (Lüth *et al.*, 2012). Hiernach konnte (2E)-Hexadecenal mittels HPLC (Merck-Hitachi) mit Fluoreszenzdetektor gemessen werden. Die Wellenlänge für die Extinktion war auf 425 nm und für die Emission auf 525 nm eingestellt. Es wurden jeweils 75 µl Probe oder Standard in das System injiziert und insgesamt wurde ein Durchgang 25 min lang gemessen, wobei die Flussrate 1,0 ml / min betrug.

Lysepuffer (pH 7,4):

25 mM	Tris/HCl
1 mM	EDTA
250 mM	Saccharose
1 mM	PMSF
10 % (v/v)	Glycerin
gelöst in	Aqua dest.

Reaktionspuffer:

87,5 mM	Saccharose
750 µM	EDTA
45 mM	Natriumfluorid
0,7125 mM	Pyridoxal-5-phosphat
43,75 mM	Kalium-Phosphat-Puffer
gelöst in	Aqua dest.

3.2.9 Calciumkonzentrations-Messungen mittels Spektrofluorometrie

HEK293-Zellen, welche stabil mit dem S1PR₃ transfiziert waren (von Prof. Meyer zu Heringdorf zur Verfügung gestellt) wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ in einem serumfreien Medium inkubiert. Am nächsten Tag konnte man das Medium direkt von den Zellkulturschalen abnehmen, da die Zellen adhärent sind. Die Zellen wurden einmal mit PBS gespült. Die Methode der intrazellulären Calciumkonzentrations-Bestimmung lehnt sich an der Publikation von Meyer zu Heringdorf *et al.* an (Meyer zu Heringdorf, D et al., 1996). Durch Zugabe von 2 ml Trypsin wurden die Zellen von der Schale gelöst und zwei Mal mit 10 ml Ca²⁺-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit 1 µM (10 µl) des Fluoreszenzfarbstoffes Fura2-AM in 10 ml Ca²⁺-Puffer beladen und bei Raumtemperatur für 30 bis 45 min im Dunkeln inkubiert. Fura2-AM bildet Chelatkomplexe mit den Ca²⁺-Ionen. In entsprechende Küvetten wurden jeweils ein Rührfisch und 1 ml des Ca²⁺-Puffers hineingegeben. Die Messung fand an einem Hitachi F2500 Spektrofluorometer statt. Durch das Programm FL Solutions konnte die Messung digital verfolgt werden. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen wurden diese in 10 ml Ca²⁺-Puffer aufgenommen und auf 1,5 ml-Eppendorfgefäße mit jeweils 1 ml der Zellsuspension verteilt. Nach erneuter Pelletierung sollten die Zellen in 1 ml Ca²⁺-Puffer resuspendiert und in die vorbereiteten Küvetten pipettiert werden. Auf diese Weise wurden die Zellen auf eine Dichte von ca. 1 x 10⁶ Zellen / ml gebracht. Die Küvette wurde sogleich in den Spektrofluorometer gestellt. Die Exzitation wurde zwischen 340 und 380 nm gehalten und die Emissionswellenlänge betrug 510 nm. Sobald eine stabile Linie detektiert wurde (nach ca. 30 sec), sollten 20 µl der Stimulanzien zu der Zellsuspension gegeben werden (1:100 Endverdünnung). Wenn die Steigung der Linie stagnierte, sollten 60 µl Digitonin zugegeben werden. Digitonin löst die Zellmembranen auf und das Ca²⁺ strömt folglich aus den Zellen. Dies resultierte in einer weiteren Steigung, welche durch 60 µl EGTA nach 20 sec abgestoppt wurde. EGTA hat hohe Affinität zu den Ca²⁺-Ionen. Durch die Bindung der Letzteren geht die Steigung mit der Zeit in eine stabile Linie über. Dann wurde der Lauf beendet und die Werte abgespeichert. Die intrazellulären Calciumkonzentrationen wurden durch die Bestimmung der maximalen und minimalen Fluoreszenz errechnet.

<u>Ca²⁺-Puffer:</u>	118 mM NaCl
	5 mM KCl
	1 mM CaCl ₂
	1 mM MgCl ₂
	5 mM D-Glucose
	15 mM HEPES pH 7,4
	Gelöst in HBSS ("Hank's balanced salt solution")

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Zytokinkonzentrationen aus dem Überstand stimulierter Zellen wurden mittels gekaufter mausspezifischer ELISA-Kits gemessen. Für die Bestimmung der IL-6- und teilweise IL-12p70 Mengen stammen diese Kits von R&D und für die IL-23- sowie zum Anfang der Arbeit auch IL-12p70 Konzentrationsmessungen von eBioscience. Die Kits von R&D sehen vor, dass die 96-Lochplatten (Mikrotiterplatten) zunächst mit dem Primärantikörper in der Verdünnung von 1:180 in PBS beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach Verwerfung des Primärantikörpers wurde die Platte mit Waschpuffer gewaschen (drei Mal) und je Loch wurden 250 µl Blockpuffer für 1 h bei RT hinzupipettiert. Nach erneutem Waschen der Platten (vier Mal) wurden die Überstände und Standards in Duplikaten (je Loch 100 µl) aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei RT sollten die Platten fünf Mal gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist, in der Verdünnung von 1:180 im Blockpuffer für 2 h bei RT inkubiert werden. Es erfolgte erneut ein fünfmaliges Waschen der Mikrotiterplatte und die Durchführung einer Meerrettich/Peroxidase/Substrat-Reaktion durch das Zugabe von HRP in 1:200 Verdünnung für 20 min. Danach wurde ein Substrat, dessen zwei Komponenten vorher frisch miteinander vermischt wurden, zugegeben (für 20 min bei RT im Dunkeln). Die Reaktion wurde durch 1 M H₂SO₄-Lösung abgestoppt und die entstandene gelbe Flüssigkeit konnte mittels Photometer SpectraMax M5^e (Molecular Devices) in einer

Wellenlänge von 450 nm und 570 nm auf die Intensität hin untersucht werden. Es wurde eine Standardgerade erstellt und die Extinktionen relativ zu dieser dargestellt. Dies gab Aufschluss über die unbekannten Konzentrationen der Zytokine je Loch einer Mikrotiterplatte. Für die Messung der IL-6 Mengen wurden die Überstände vorher 1:200 verdünnt. Dieser Faktor wurde bei der Auswertung der gemessenen IL-6 Werte wieder mit einberechnet. Es wurden die Absolutwerte dargestellt. Bei dem IL-12p70-ELISA von R&D wurden die Absolutwerte teilweise auf die Gesamtzellzahl bezogen. Im Unterschied zu R&D, empfiehlt der Hersteller von eBioscience die Platten mit der Erstantikörper-PBS-Lösung in der Verdünnung von 1:250 bei 4°C über Nacht zu beschichten. Des Weiteren wird zum Blockieren und Verdünnen von Antikörpern ein spezieller „Assay diluent“ mitgeliefert, welcher 1:5 in H₂O verdünnt werden soll. Der Zweitantikörper wird ebenfalls 1:250 aufgetragen, jedoch für nur 1 h bei RT inkubiert. Für die Messung der IL-12p70 Mengen wurden die Überstände anfänglich infolge einer zu hohen Konzentration 1:4 verdünnt und später hat man diesen Faktor wieder in die Auswertung einbezogen. In den darauffolgenden Experimenten war die Verdünnung der Überstände für die IL-12p70 Messung jedoch überflüssig.

<u>ELISA Waschpuffer:</u>	1 x PBS
	0,05 % Tween-20

<u>ELISA Blockpuffer (R&D):</u>	1 x PBS
	1 % BSA

3.3.2 SDS-Page

Die isolierten Proteine aus dem Gesamtzelllysat wurden auf 10% oder 12,5% denaturierende Polyacrylamidgele (10 x 8 cm; 1,5 mm) aufgetragen (**Tabelle 2**). Hierzu sollten die Proben zunächst auf den gleichen Proteingehalt durch die Verdünnung mit H₂O auf insgesamt 36 µl gebracht werden. Nach der Zugabe von 12 µl Ladepuffer wurden die Proben bei 95°C für 5 min gekocht und auf das gegossene Gel aufgetragen. Als Orientierung diente ein Proteinmarker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard, Bio-Rad oder Protein Marker VI, AppliChem). Mit Hilfe der Apparatur Mini-

PROTEAN Cell 3 (Bio-Rad) wurden die Proteine im SDS-Laufpuffer zunächst bei 75 V für 10 min, dann bei 110 V bis zum gewünschten Punkt aufgetrennt. Danach konnte das Gel für den Western Blot verwendet werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen für SDS-Page.

<i>Trenngel 10% / 12,5%</i>	<i>Volumen</i>	<i>Sammelgel 4%</i>	<i>Volumen</i>
Wasser	4,1 / 3,4 ml	Wasser	1,5 ml
Acrylamid	3,3 / 4,1 ml	Acrylamid	330 µl
1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	1,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	630 µl
10% SDS	100 µl	10% SDS	25 µl
10% APS	50 µl	10% APS	12,5 µl
TEMED	5 µl	TEMED	2,5 µl

Ladepuffer (4 x Lämmli):

0,677 µl Aqua dest.
 0,833 µl 1,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)
 5,0 ml Glycerol
 2,0 ml 20 % SDS
 0,4 ml 0,5% Bromphenolblau
 1,0 ml β-Mercaptoethanol

SDS-Laufpuffer (10 x SDS):

20 g SDS
 60 g TRIS
 288 g Glycin
 ad 2 l Aqua dest.

3.3.3 Western Blot

Durch den Western Blot werden spezifische Proteinbanden detektiert, welche darüber Aufschluss geben sollen, ob und in welcher Menge ein Protein produziert wird. Zunächst

müssen die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine von den Gelen auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran transferiert werden. Hierzu wurden die in der **Abbildung 4** dargestellten Blot-Papiere (Filterpapiere) in Blotpuffer A, B oder C geschwenkt und zusammen mit der PVDF-Membran und dem Acrylamidgel aufeinandergelegt. Durch vorsichtiges Rollen sollten die Luftblasen entfernt und mit Hilfe der Trans-Blot SD Semi-Dry Apparatur (Bio-Rad) unter einem Stromfluss bei 0,04 A pro Gel für 45 min transferiert werden.

<u>Puffer A:</u>	0,3 M TRIS 20 % Methanol pH 10,4
<u>Puffer B:</u>	25 mM TRIS 20 % Methanol pH 10,4
<u>Puffer C:</u>	25 mM TRIS 0,04 M ϵ -Amino-n-Caprinsäure 20 % Methanol pH 9,4

Die Membran wurde 2 x 8 min im Waschpuffer gewaschen, für 1 h im Blockpuffer inkubiert und nochmals 2 x 15 min gewaschen. Sogleich folgte eine Inkubation mit einer entsprechenden Primärantikörper-Lösung über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde am nächsten Tag wieder im Waschpuffer für 1 h gewaschen und für eine weitere Stunde mit der Zweitantikörper-Lösung bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift für 1 h wurde die Membran mit frisch vermischem ECL Western Blotting Substrat (4ml; Pierce) für 1 min rotierend aktiviert. Danach wurde diese auf Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten entwickelt. Die Antikörper konnten (nach einem kurzen Waschschrift) durch 10 ml Restore Western Blot Stripping Buffer

(Thermo Scientific) für 30 min bei 37°C entfernt werden, um die Membran mit neuen Antikörpern zu inkubieren. Dies konnte zur Kontrolle der gleichmäßigen Auftragung der Proteine erfolgen. Die Kontrollantikörper waren dabei gegen β -Aktin gerichtet. Nach dem 30-minütigen Waschen der Membran, wurde diese wieder zum Blockieren inkubiert, gewaschen und der Erstantikörper gegen β -Aktin wie beschrieben eingesetzt.

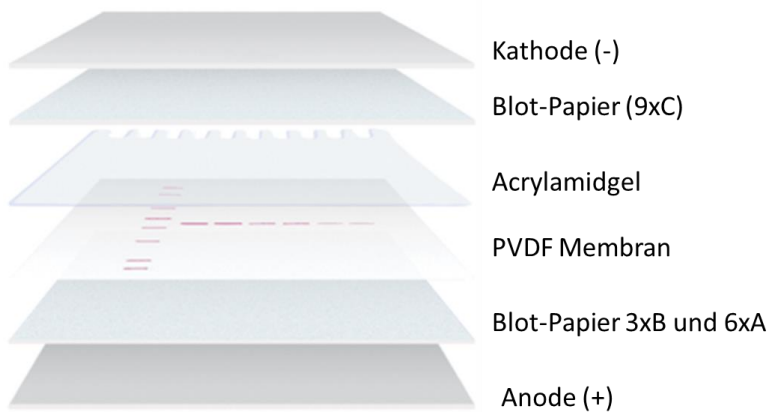


Abbildung 4: Reihenfolge der zu stapelnden Western Blot-Komponenten. (Quelle: www.biorad.com (modifiziert)).

Waschpuffer 1 (PBST):

1 x PBS

0,05 % Tween 20

pH 7,5

Waschpuffer 2 (TBST):

100 mM TRIS

0,15 M NaCl

0,05 % Tween 20

pH 7,5

Blockpuffer:

1% BSA oder 5 % Milchpulver (MP)

in PBST oder TBST

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper zur Durchführung des Western Blots.

Antikörper gegen:	Wirt / Spezifität	Konz.	Block- / Wasch-Puffer	Herkunft
h-RIP (C-12)	M / M, R, H	1:500	1% BSA /PBST	Santa Cruz #sc-133102
m-Polyubiquitin, Lys63-spezifisch	M / H, M	1:1000	1% BSA / PBST	Enzo #PW0600-0100
h-TRAF2 (N-19)	K / M, R, H	1:500	1% BSA /PBST	Santa Cruz #sc-877
h-TRAF2 (C192)	K / M, H	1:1000	5% MP / TBST	Cell Signalling #4724
h-Caspase3	K / H, M, R	1:800	5% MP / TBST	Cell Signalling #9662
m-S1P Lyase	K / M	1:1000	5% MP / TBST	EuroGentec
m-S1P Lyase	K / M, R	1:500, 1: 1000	5% MP / TBST /PBST	Abcam #ab56183
h-S1P Lyase	Z / H	1:1000	5% MP / TBST	R&D #AF5535
h-S1P Lyase	K / M, R, H	1:1000	5% MP / PBST	Santa Cruz #sc-67368
β-Aktin	M / H, M	1:5000	5% MP / PBST	Sigma #A5441
r-IgG HRP	E / K	1:2500/ 1500	3% / 5% MP / TBST	GE Healthcare #NA934
z-IgG HRP	E / Z	1:3000	3% MP / TBST	Santa Cruz #sc-2020
m-IgG HRP	S / M	1:5000	1% BSA /PBST	GE Healthcare #NA931

K= Kaninchen; M=Maus; E=Esel; S= Schaf; H=Human; R=Ratte; Z=Ziege

3.3.4 Ubiquitin Assay

Für den Assay sollte eine große Anzahl von BM-DCs stimuliert werden (45×10^6 / 45 ml). Nach der Stimulation wurden diese von den T175-Zellkulturflaschen abgeschabt und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Die Zellpellets wurden dann in 400 µl RIPA-Puffer 2 lysiert und konnten bei -80°C aufbewahrt werden. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wurden die Pellets zur vollständigen Lyse mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Branson Sonifier 450, Heinemann Labortechnik, Schwäbisch Gmünd) sonifiziert (10 bis 15 Impulse bei 58 W) und danach wieder 10 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zentrifugation bei 12000 g_n für 10 min. Der Überstand mit den darin befindlichen Membran- und Zytoplasmaproteinen wurde abgenommen und für 8 min bei 95°C gekocht. Die Lysate wurden 1:10 mit RIPA-Puffer 1 (ohne SDS und mit 150 mM NaCl) verdünnt. Danach fand nach Herstellerangaben von Invitrogen die

Immunpräzipitation der Lysate statt: Die am Tag zuvor an „Dynabeads“ gekoppelten Antikörper gegen RIP1 oder TRAF2 wurden hier jedoch mit dem RIPA-Puffer 1 (ohne SDS und mit 150 mM NaCl) gewaschen. Bei dem dreimaligen Waschen der Beads hintereinander wurde RIPA-Puffer 2 (mit 150 mM NaCl, 1% SDS, Vanadat, Proteininhibitorcocktail und PMSF) verwendet. Auch bei dem Endschritt wurden die Beads in 60 µl RIPA-Puffer 2 resuspendiert und auf dem Rotator bei RT für 5 min inkubiert. Die Gefäße mit den Beads wurden nach jedem Waschgang auf einen Magnetständer gestellt, so dass der Überstand leicht abgenommen werden konnte. Nach der Immunpräzipitation von RIP1 und TRAF2 erfolgten die Proteinmessung mittels BCA, dann die SDS-Page und anschließend der Western Blot, um RIP1, Lys63-spezifisches Polyubiquitin oder TRAF2 nachzuweisen. Die immunpräzipitierten Lysate wurden auf 10 µg Proteininhalt eingestellt.

RIPA-Puffer 1: 50 mM Tris pH 7,5
 0,25% Deoxycholsäure
 1% NP40
 1 mM EDTA
 1 mM EGTA
 0,01 M N-Ethylmaleimid
 150 mM NaCl

RIPA-Puffer 2: 1% SDS
 2 mM Na₃VO₄
 25 x Proteinaseinhibitorcocktail
 1 mM PMSF
 in RIPA-Puffer 1

3.3.5 Durchflusszytometrie

Ausdifferenzierte stimulierte KM-DCs wurden auf spät apoptotische / nekrotische Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen nach der jeweiligen Stimulationszeit von 6-Lochplatten abgeschabt und in FACS-Gefäße verteilt. Nach Zentrifugation wurden die Überstände verworfen und die Zellpellets mit 500 µl kaltem PBS gewaschen. Nach erneutem Pelletieren wurden Zellen in 500 µl Annexin-Puffer aufgenommen, geschüttelt und abzentrifugiert. Dann sollten 70 µl des Annexin-Puffers mit der entsprechenden Menge an Annexin V-FITC (5 µl pro 1×10^6 Zellen, ImmunoTools) in jedes Gefäß gegeben, geschüttelt und bei RT im Dunkeln für 15 min inkubiert werden. Anschließend wurden 5 µl pro 1×10^6 Zellen des 7-AAD-PerCP (eBioscience) hinzugegeben und nach dem Schütteln für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden zusätzlich durch 400 µl Annexin-Puffer verdünnt und konnten am Durchflusszytometer Cantoll von BD innerhalb einer Stunde gemessen werden. Die Werte wurden mittels des Programms FlowJo (Tree Star Inc.) ausgewertet.

<u>Annexin-Puffer:</u>	0,1 M HEPES NaOH pH 7,4
	1,4 M NaCl
	25 mM CaCl ₂
	in Aqua dest.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 DNA Isolierung

Für die Bestimmung des Genotyps aus WT- und SphK1^{-/-} (C57BL/6)-KM-DCs wurden unstimulierte und im Stickstoff aufbewahrte Zellen wieder aufgetaut. Die DNA wurde mittels Säulen von peqGold Blood DNA Mini Kit (peqLab) nach Herstellerangaben isoliert. Eluiert wurde die DNA mit 50 µl Elutionspuffer, welche dann im Photometer, Nano-Drop 1000 (ThermoScientific), auf ihre Konzentration hin bestimmt wurde.

Alternativ für die Genotypisierungen der SphK1^{-/-}(C57BL/6)-, SphK1^{-/-}(BALB/c)-, SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-} und der SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}-Mäuse wurde die DNA aus Schwanzbiopsien der jeweiligen 3 bis 4 Wochen alten Mäuse isoliert. Hierzu wurden zu jeder Probe 500 µl eines Puffers („mouse tail buffer“) mit 20 µl einer 10 mg/ml-konzentrierten Proteinase K-Lösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5) gegeben und über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden 75 µl einer 8 M Kaliumacetatlösung und 500 µl Chloroform hinzupipettiert und geschüttelt. Nach einer Inkubation bei -80°C für 15 min wurden die Proben bei 13000 g_n für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Überstände sollten hiernach in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt, 1 ml 100% Ethanol zugefügt und gemischt werden. Nach einer weiteren Inkubation der Proben bei -80°C für 1 h wurden diese bei 13000 g_n für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Pellet mit 1 ml einer 70% Ethanol-Lösung bei RT gewaschen und vorsichtig gemischt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13000 g_n für 10 min. Nach wiederholtem Verwerfen der Überstände wurde das Pellet getrocknet und in 40 bis 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA) resuspendiert. Die isolierte DNA wurde bei -80°C gelagert.

<u>Puffer („mouse tail buffer“):</u>	0,5% SDS
	0,1 M NaCl
	0,05 M Tris pH 8,0
	3 mM EDTA
	in H ₂ O

3.4.2 RNA Isolierung

Nach der Stimulation der KM-DCs wurden pelletierte 0,5 bis 2 x 10⁶ Zellen pro Probe mit Hilfe des peqGold Total RNA Kits (peqLab, Erlangen) nach Vorschriften des Herstellers zur RNA-Isolation herangezogen. Daraufhin wurde die RNA-Konzentration aus jeder Probe mit dem Nano-Drop 1000 (ThermoScientific) Photometer ermittelt.

3.4.3 cDNA-Synthese

Für jede Probe wurde die isolierte mRNA durch das Verdünnen mit H₂O (auf insgesamt 10 µl) auf 0,5 bis 1 µg mRNA gebracht. Mit Hilfe der reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) wurde die mRNA in komplementäre cDNA umgeschrieben. Das gekaufte High-Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) wurde nach Herstellerangaben verwendet (**Tabelle 4**). Das Programm für die PCR im Thermocycler (Biometra) sah vor die Proben im ersten Schritt für 10 min bei 25°C, dann für 120 min bei 37°C und anschließend für 5 min bei 85°C zu inkubieren.

Tabelle 4: Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermixes.

<i>RT-PCR Mastermix</i>	<i>Volumen [µl]</i>
RT-Puffer	2,0
dNTPs	0,8
Random Primer	2,0
Reverse Transkriptase	1,0
H ₂ O	4,2

3.4.4 Qualitative PCR

Die SphK1^{-/-}(C57BL/6)-, SphK1^{-/-}(BALB/c)-, SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-} und SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}-Mäuse wurden mittels der qualitativen PCR mit den in der **Tabelle 5** angegebenen Primerpaaren genotypisiert. 0,5 µg der DNA wurden zunächst mit Aqua dest. auf ein Volumen von 40,3 µl gebracht. Dann sollte ein Mastermix mit den darin enthaltenen Reagenzien und Primern erstellt werden (**Tabelle 6**). Von diesem Mastermix wurden 9,7 µl in jede Probe pipettiert. Die Proben mit jeweils 50 µl Gesamtvolumen wurden dann in den Thermocycler gestellt und je nach dem jeweiligen Genotyp sollte ein entsprechendes Programm zur Amplifikation des jeweiligen Genabschnitts gestartet werden (**Tabelle 7**). Die amplifizierte DNA wurde mit einem blau gefärbten „loading dye“

vermischt und je nach der Fragment-Größe auf 1 - 1,5%ige Agarosegele aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese fand bei 75 - 110 V im TAE-Puffer in einer Sub Cell GT Gelkammer (Bio-Rad) statt. Zur Auswertung der aufgetrennten DNA wurden die Gele in einer GELDOC Kammer (Bio-Rad) mit UV-Licht belichtet und gespeichert.

Tabelle 5: Primer für die Genotypisierungen.

Genotyp	Primer	Sequenz 5'-3'	Basenpaare
SphK1 ^{-/-} (C57BL/6)	m-SK1 FW	GGC ACC TTC TTT CGC CTA G	366
	m-SK1 RV	TGG ACA GTC AAG TTC CAT ATG C	
SphK1 ^{-/-} (BALB/c)	SPHK-1 Ex6fw	ATGTGAAGCTGTGCAGGGCC	WT: 534 KO: 735
	SPHK-1 Cont12rev	GCGAAGTGCCCAACACCAGC	
	SPHK-1-Neo1 fw	TGA TAT TGT TGA AGA GCT TGG CGG C	
SPL ^{Flox/Flox} Cre ^{+/-}	Fw_Cre	CCGGGCTGCCACGACCAAGT	590
	Rv_Cre	ATCTCGCGCGGCTCCGACAC	

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermixes für die qualitative PCR.

PCR Mastermix	Konz.	Volumen [µl]
PCR-Puffer	10 x	5,0
dNTPs	10 mM	1,0
Primer 1	10 pmol/µl	1,0
Primer 2	10 pmol/µl	1,0
MgCl ₂	50 mM	1,5
DNA	0,5 µg	x
Taq-Polymerase	5 u/µl	0,2
Aqua dest.		ad 50

Tabelle 7: PCR-Programm der entsprechenden Genotypisierungen.

<i>SphK1^{-/-}</i> (C57BL/6)Programm	Temp. [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Denaturierung	94	2	32
Denaturierung	94	1	
Annealing	56	1	
Elongation	72	1	
Fin. Elongation	72	10	
Aufbewahrung	4	∞	
<i>SphK1^{-/-}</i> (BALB/c)Programm			
Denaturierung	94	2	35
Denaturierung	94	1	
Annealing	60	1	
Elongation	72	1	
Fin. Elongation	72	10	
Aufbewahrung	4	∞	
<i>SPL^{Flox/Flox}</i> <i>Cre^{+/-}</i> Programm			
Denaturierung	94	2	35
Denaturierung	94	1	
Annealing	63	1	
Elongation	72	1	
Fin. Elongation	72	10	
Aufbewahrung	4	∞	

Für die Amplifikation der unterschiedlichen Exonbereiche der S1P Lyase aus stimulierten murinen C57BL/6-WT-Mäusen wurde 1 µg der cDNA und die in der **Tabelle 8** angegebenen Primerpaare eingesetzt. Entsprechend der **Tabelle 9** wurde das PCR-Programm gewählt. Bei der PCR des Exons 8 (80 bp) sollte das „Annealing“ bei 58°C stattfinden.

Tabelle 8: Primer für die PCR unterschiedlicher Exon-Bereiche der S1P Lyase.

Bereich	Primer	Sequenz 5'-3'	Basenpaare
Exon 8-10	Sgpl1Ex8-10fw_new	CGTTAGAGAAGGGGATCAAA	212
	Sgpl1Ex8-10rv_new	CATCACACCATGAGGAACT	
Exon 6-8	Sgpl1Ex6-8fw_new	GTACAATGGGGAACCGAAG	247
	Sgpl1Ex6-8rv_new	TTTGATCCCCTTCTCTAACG	
Exon 8	sgpl1Ex8fw_new	TTCTGGGGGAACGGAAAG	80
	sgpl1Ex8rv_new	CTGGAGTTTTGATCCCCTTC	

Tabelle 9: PCR-Programm für die Amplifikation der S1P Lyase-Exons.

S1P Lyase Programm	Temp. (°C)	Dauer (min)	Zyklen
Denaturierung	94	2	24
Denaturierung	94	1	
Annealing	57/58	1	
Elongation	72	1	
Fin. Elongation	72	10	
Aufbewahrung	4	∞	

50 x TAE-Puffer: 57,1 ml Eisessig
 242 g TRIS
 37,2 g Na₂EDTA*2H₂O
 ad 1 l Aqua dest.

3.4.5 Quantitative Realtime-PCR

Für die quantitative Echtzeit- (qRealtime-) PCR wurden „TaqMan® gene expression assays“ für die Gene murines IL-12p35, mIL-12p40, mS1P Lyase, mSphK1/2, mS1P Phosphatase1/2, m18S und mGAPDH von der Firma Life Technologies (Carlsbad, CA) verwendet. Weitere Kontrollgene (mCsnK2a2 und mFbxo38) und ein Assay für die Detektion des Exons 8 der mS1P Lyase wurden von Primer Design (Southampton,

Großbritannien) gekauft. Die Assays beinhalten unmarkierte PCR Primer mit Carboxyfluorescein (FAM)/Tetramethylrhodamin (TAMRA) markierten Sonden. Ein Mastermix wurde entweder von Life Technologies („TaqMan FAST Advanced Master Mix“) oder von Primer Design („Precision FAST Mastermix“) genutzt. Jede Probe wurde in dem 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) zweifach gemessen. Bei dem zu laufenden Programm wurden für den ersten Schritt 95°C für 20 sec gewählt (1x), danach sollte der zweite Schritt bei derselben Temperatur für 3 sec und der dritte Schritt bei 60°C für 30 sec für 40 Zyklen (40x) laufen. Als Referenz wurden die Kontrollgene 18S, GAPDH oder CsnK2a2 und Fbxo38 gemessen und bei der Auswertung wurden diese von den gemessenen Genwerten abgezogen. Zusätzlich ist die Änderung der mRNA-Expression relativ zu der unstimulierten Kontrolle berechnet.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die quantitative Realtime-PCR.

<i>qRT-PCR Reaktionsansatz</i>	<i>Konz.</i>	<i>Volumen [µl]</i>
TaqMan FAST Advanced Master Mix/ Precision FAST Mastermix	2x	5,0
TaqMan Gene Expression Assay	20x	0,5
cDNA		1,0
Aqua dest.		Ad 10

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen sich in drei große Abschnitte aufteilen: Zu Anfang der Doktorarbeit wurden Untersuchungen einer möglichen Interaktion von Signalmolekülen, TRAF2 mit TRAF6, angestellt. Hierbei stand das intrazelluläre S1P als sekundärer Messenger und dessen Wirkungen auf die IL-12p70 Produktion muriner KM-DCs nach einer Stimulation in Kombination mit TNF- α im Fokus. Auch wurden die wichtigsten zellulären Vorgänge, welche durch TNF- α ausgelöst werden, in KM-DCs überprüft.

Ein weiterer Abschnitt befasst sich hauptsächlich mit den hemmenden Effekten des extrazellulären S1P auf die Zytokinsekretion. Es wurden zunächst zeitlich-determinierte Stimulations-Analysen durchgeführt, um die LPS-induzierten und sekretierten IL-12p70 Mengen zu evaluieren. Daraufhin wurde exogenes S1P in dessen unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und die resultierende Reduktion dieses Zytokins in einem zeitlichen Verlauf beobachtet. Auf dieser Basis sollten spezifisch entwickelte S1P-neutralisierende Spiegelmer als Werkzeug auf die Auswirkungen der IL-12p70 Verstärkung untersucht werden.

Im abschließenden und größten Teil dieser Arbeit wurde die TLR-vermittelte Regulation der S1P-generierenden und –metabolisierenden Enzyme und Sphingolipide in murinen KM-DCs analysiert. Das Hauptaugenmerk lag zunächst auf der Aufklärung der S1P Lyase-Regulation, da es maßgeblich an der Steuerung von S1P-Konzentrationen beteiligt ist. Nach gründlichen Untersuchungen der TLR-stimulationsabhängigen S1P Lyase-Produktion auf mRNA- und Enzymaktivitätsebene wurden weitere Enzyme und Sphingolipid-Konzentrationen auch zeitabhängig charakterisiert. Die Stimulationen über eine längere Zeit hinweg implizierten Analysen der damit verbundenen Zellapoptose durchzuführen. Somit wurde zum ersten mal in murinen KM-DCs ein Verlauf der TLR-induzierten Regulation unterschiedlicher Sphingolipid-Enzyme in Verbindung mit einem inflammatorischen Zytokinsturm und Zellapoptose aufgedeckt. Des Weiteren wurde ein murines Tamoxifen-induzierbares System zur Ausschaltung der S1P Lyase *in vitro* und *in vivo* als weiteres nützliches Werkzeug zu Untersuchungen der intrazellulären S1P-Effekte erprobt.

4.1 Untersuchungen einer Interaktion von TRAF2 mit TRAF6 durch TNF- α -Stimulation und intrazelluläres S1P sowie Überprüfung einer TNF- α -Aktivität in KM-DCs

In den letzten Jahren wurde die Rolle von S1P als intrazellulärer sekundärer Messenger eingehend beschrieben (Payne et al., 2002). Eine Studie belegte, dass das durch TNF- α implizierte und durch SphK1 produzierte intrazelluläre S1P die TRAF2/RIP1/NF- κ B-Signalkaskade in A7-, HEK293- oder HeLa-Zellen verstärkt (Alvarez et al., 2010). Auf diesem Wissen bauend, untersuchten wir zunächst die Wirkung von TNF- α und LPS auf die Produktion von IL-12p70. Die Motivation war hierbei eine mögliche Interaktion zwischen TRAF2 (aktiviert durch TNF- α) und TRAF6 (durch LPS aktiviert) auszulösen, um die IL-12p70 Sekretion aus DCs durch intrazelluläres S1P zu verstärken. Eine direkte oder -durch weitere Signalmoleküle nachgeschaltete- indirekte Interaktion zwischen TRAF2 und TRAF6 wurde bisher nur in wenigen Studien bewiesen (Chung et al., 2002; Fujino et al., 2007; Sasai et al., 2010; Ogolla et al., 2013).

4.1.1 Einfluss der Ko-Inkubation von TNF- α auf die Zytokin-Produktion muriner KM-DCs als Messinstrument einer möglichen Interaktion von TRAF2 mit TRAF6

Um zu untersuchen, ob durch TNF- α und das durch SphK1-abhängige intrazelluläre S1P (S1P_i) die IL-12p70 Sekretion aus BM-DCs positiv verändert wird, wurden drei Herangehensweisen getestet:

1. Die Zellen wurden durch TNF- α für 2 und 6 h vorinkubiert und dadurch sensitiviert. Somit sollte die TRAF2-Signalkaskade in Gang gebracht werden, so dass das durch die LPS-Stimulation aktivierte TRAF6 mit TRAF2 in Interaktion tritt.
2. Auch eine Nachinkubation durch TNF- α für nur 2 h wurde durchgeführt. Hier sollte zunächst eine Aktivierung von TRAF6 durch LPS erfolgen, welche die Interaktion mit dem nachgeschalteten TRAF2 (aktiviert durch TNF- α) hervorruft.

3. Vervollständigt wurde die Testreihe dadurch, dass beide Stimulanzen gleichzeitig für 20, 22 und 26 h zu den Zellen gegeben wurden.

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde in der Gruppe gezeigt, dass stimulierte SphK1-defiziente DCs eine erhöhte IL-12p70 Sekretion im Vergleich zu WT-Zellen aufweisen. Durch zugesetztes S1P wurde dieser Effekt wieder aufgehoben. Es wurde somit aufgedeckt, dass die IL-12p70 Sekretion durch SphK1, durch das mittels dieses Enzyms produzierte und aus der Zelle transportierte extrazelluläre S1P und dessen Assoziation mit dem S1PR₁ negativ reguliert wird. Um einerseits die schon bekannten Befunde der IL-12p70 Verstärkung durch die Abwesenheit des extrazellulären S1P (S1P_e) zu überprüfen, dienten als Kontrolle Proben aus SphK1-defizienten BM-DCs. Andererseits wurde erwartet, dass die TNF- α -Ko-Inkubation in diesen Zellen keinen Effekt erzielt, da durch die SphK1-Defizienz auch das S1P_i am TRAF2-Molekül abwesend sein sollte. Da zu dem Zeitpunkt keine SphK1-defizienten murinen Weibchen zur Verfügung standen, wurden diese Experimente mit Zellen aus WT- und SphK1^{-/-}- Männchen durchgeführt.

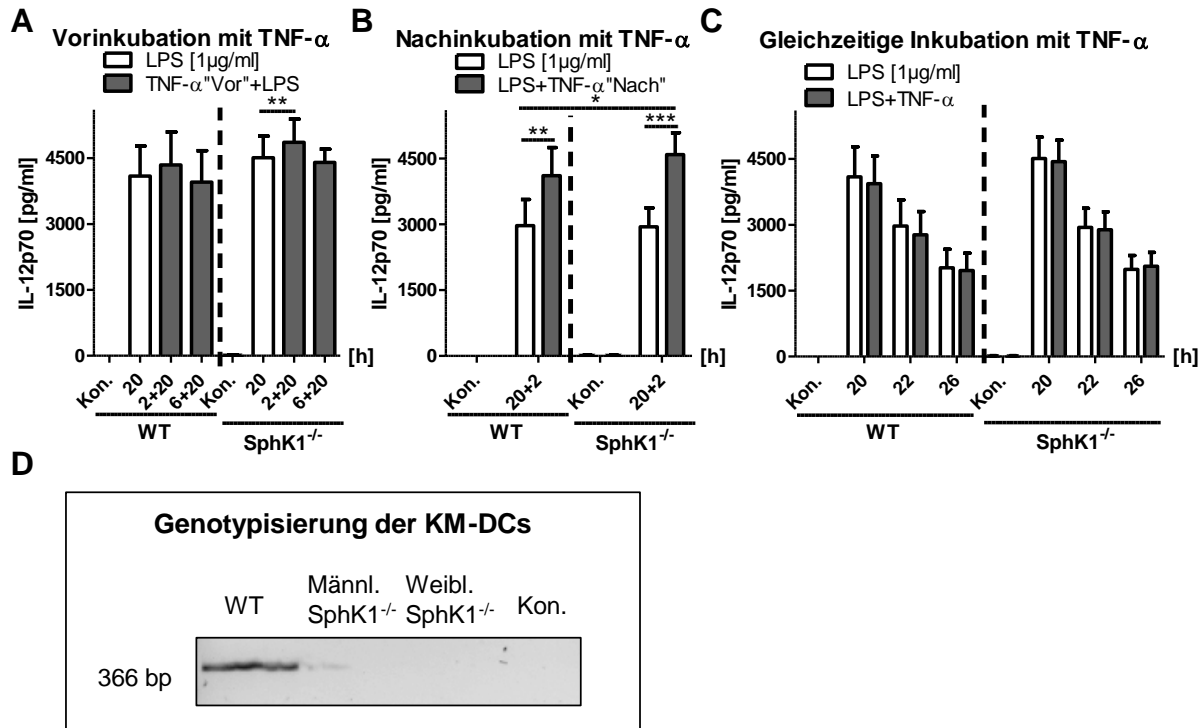


Abbildung 5: IL-12p70 Sekretion aus männlichen mit LPS und TNF- α stimulierten WT- und SphK1^{-/-}-KM-DCs sowie Überprüfung der Gendefizienz der SphK1^{-/-}-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden in (A) entweder mit LPS für 20 h inkubiert (weiße Balken) oder auf die TNF- α -Stimulation (10 ng/ml) für 2 und 6 h folgte die LPS-Zugabe (1 μ g/ml) für 20 h (graue Balken). n=4. In (B) wurde mit LPS alleine für 22 h stimuliert oder zunächst mit 1 μ g/ml LPS für 20 h, danach zusätzlich mit 10 ng/ml TNF- α für 2 h stimuliert. n=4. In (C) wurden die Zellen entweder mit LPS alleine oder mit 1 μ g/ml LPS und 10 ng/ml TNF- α für 20, 22 und 26 h stimuliert. n=4. Die Überstände wurden für die Messung der IL-12p70 Konzentration mittels ELISA genutzt. Statistische Signifikanz wurde per gepaartem t Test ermittelt. Kon. = unstimulierte Kontrolle. In (D) wurde DNA aus KM-DCs des jeweiligen Genotyps isoliert und eine PCR mit spezifischen Primern für SphK1 durchgeführt. n=1.

Die Vorstimulation der WT-DCs mit TNF- α hatte keinen Effekt auf die IL-12p70 Produktion (**Abbildung 5 A**). Des Weiteren erzielte die Ko-Inkubation nach 2 h in den SphK1-defizienten Zellen eine signifikante, jedoch SphK1-/S1P_i-unspezifische Erhöhung von IL-12p70 verglichen zur alleinigen Stimulation durch LPS. Bei der Nachinkubation durch TNF- α wurde ein signifikanter Effekt sowohl in den WT-DCs als auch wieder unspezifisch in den SphK1^{-/-}-Zellen im Vergleich zur jeweiligen LPS-Kontrolle gemessen (**Abbildung 5 B**). Die gleichzeitige Stimulation von LPS und TNF- α ergab keine Veränderung in der IL-12p70 Produktion durch Zellen beider Genotypen (**Abbildung 5 C**). Die Stimulation mit TNF- α alleine ergab Werte zwischen 0 und 30 pg/ml, welche

vergleichbar mit Werten der unstimulierten Kontrolle waren. Eine Erhöhung der IL-12p70 Produktion in SphK1^{-/-}-Zellen konnte in KM-DCs muriner Männchen nicht bestätigt werden. Der Nachweis einer tatsächlichen SphK1-Defizienz wurde jedoch in Männchen und Weibchen gleichermaßen durch die fehlende Bande bei 366 bp, welche in der Genotypisierung das Vorhandensein von SphK1 anzeigt, nachgewiesen (**Abbildung 5 D**). Schlussfolgernd, war die IL-12p70 Erhöhung nach TNF- α -Inkubation entweder SphK1-/S1P₁-unspezifisch oder ganz abwesend.

Als Konsequenz wurde TNF- α zusammen mit dem TLR9-Ligand (CpG) in den drei vorher genannten Varianten zu den Zellen gegeben. CpG aktiviert den Signalweg allein über MyD88. Das Signalmolekül TRAF6 könnte somit durch CpG stärker aktiviert werden als durch LPS, welches sowohl MyD88 als auch TRIF induziert.

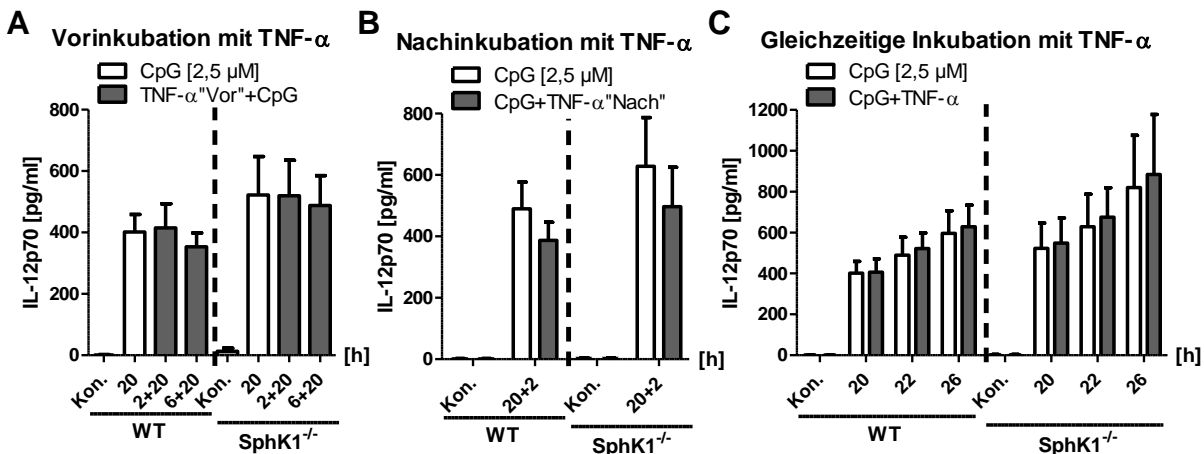


Abbildung 6: IL-12p70 Konzentrationen aus männlichen mit CpG und TNF- α stimulierten WT- und SphK1^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden in (A) entweder mit CpG für 20 h inkubiert oder zunächst mit 10 ng/ml TNF- α für 2 und 6 h, anschließend mit CpG (2,5 μ M) für 20 h stimuliert. In (B) wurde mit CpG alleine für 22 h inkubiert oder zunächst mit 2,5 μ M CpG für 20 h, danach zusätzlich mit 10 ng/ml TNF- α für 2 h stimuliert. In (C) wurden die Zellen entweder mit CpG alleine oder mit 2,5 μ M CpG und 10 ng/ml TNF- α für 20, 22 und 26 h stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurde die IL-12p70 Konzentration aus dem Überstand mittels ELISA gemessen. Kon. = unstimulierte Kontrolle. n=4.

Im Gegensatz zur LPS-abhängigen TNF- α -Ko-Stimulation bewirkte die Aktivierung durch CpG keinen Anstieg von IL-12p70 (**Abbildung 6**). Bei der Nach- und

gleichzeitigen Inkubation traten sogar gegensätzliche Effekte im Vergleich zur LPS-Stimulation auf. Auffällig ist, dass in der Kinetik durch LPS die hohen IL-12p70 Mengen nach 20 h stetig sinken, nach CpG jedoch steigen die Zytokin-Konzentrationen. Dies impliziert eine zeitliche Verschiebung der IL-12p70 Sekretion durch CpG aufgrund der unterschiedlich hohen Menge des produzierten IL-12p70 im Vergleich zur LPS-Stimulation.

Als weitere Kontrolle für die TNF- α -verstärkende Wirkung diente die Messung von IL-6. Es wurde beschrieben, dass das durch SphK1 gebildete S1P_i an dem TRAF2-Molekül höhere IL-6 Mengen erzielen kann (Alvarez et al., 2010). Erwartet war ein höherer Anteil an IL-6 in den TNF- α -ko-stimulierten Zellen verglichen zu den alleinigen LPS- oder CpG-Inkubationen. Des Weiteren wurden auch SphK1^{-/-}-DCs als Kontrolle herangezogen, welche keinen Anstieg von IL-6 durch TNF- α zeigen sollten, aufgrund des fehlenden S1P_i am TRAF2-Molekül.

Das Ergebnis in der **Abbildung 7** zeigt folgende unterschiedliche Effekte: die Vorinkubation mit TNF- α in WT-Zellen war vergleichbar mit der alleinigen LPS-Stimulation. Jedoch gab es signifikante Konzentrationsunterschiede von IL-6 nach 2 h der CpG-Stimulation (**Abbildung 7 A und D**). In den SphK1^{-/-}-DCs war nach LPS + TNF- α wiederum ein S1P_i-unspezifischer verstärkender Effekt zu sehen. Die Nachinkubation bewirkte einen marginalen Anstieg von IL-6 durch LPS + TNF- α , welcher S1P_i-unspezifisch ist. CpG + TNF- α hatten keinen positiven Einfluss auf die IL-6 Sekretion in WT-DCs (**Abbildung 7 B und E**). Ebenfalls hatte die gleichzeitige Zugabe der beiden Stimulanzen zu den WT-Zellen keinen IL-6-fördernden Effekt (**Abbildung 7 C und F**). Die Stimulation der Zellen mit TNF- α alleine ergab zu den Kontrollwerten vergleichbare IL-6 Konzentrationen. Weiterhin scheint IL-6 nach LPS an der oberen Grenze der produzierbaren Menge zu sein.

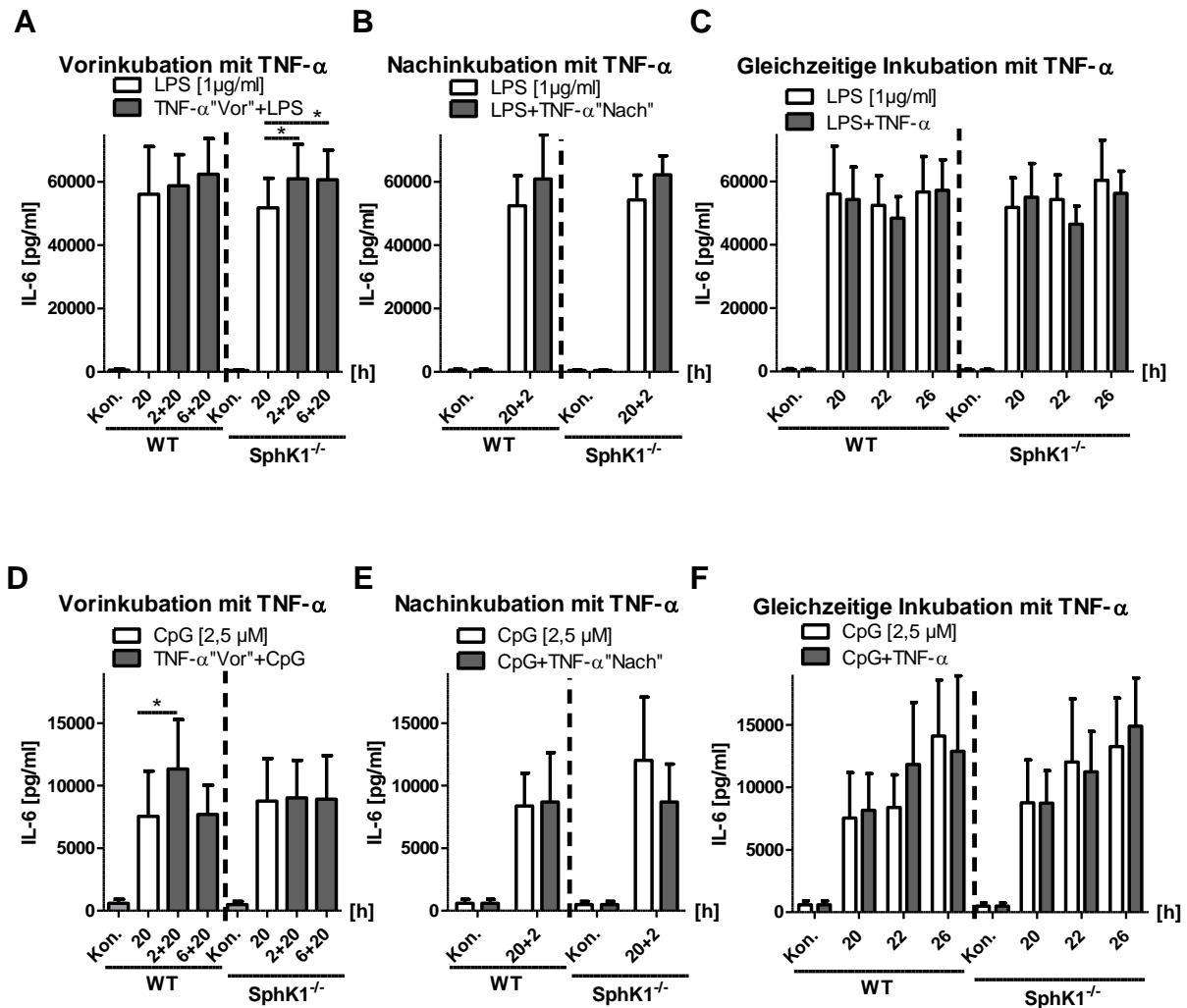


Abbildung 7: IL-6 Sekretion aus männlichen mit LPS/CpG und TNF- α stimulierten WT- und SphK1^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden in (A) und (D) entweder mit LPS/CpG für 20 h inkubiert (weiße Balken) oder auf die TNF- α -Stimulation (10 ng/ml) für 2 und 6 h folgte die LPS-/CpG-Zugabe (1 μ g/ml / 2,5 μ M) für 20 h (graue Balken). In (B) und (E) wurde mit LPS/CpG alleine für 22 h oder zunächst mit 1 μ g/ml LPS / 2,5 μ M CpG für 20 h, danach zusätzlich mit 10 ng/ml TNF- α für 2 h stimuliert. In (C) und (F) wurden die Zellen entweder mit LPS/CpG alleine oder mit 1 μ g/ml LPS / 2,5 μ M CpG und 10 ng/ml TNF- α für 20, 22 und 26 h stimuliert. Die Überstände wurden für die Messung der IL-6 Konzentration mittels ELISA genutzt. Statistische Signifikanz wurde per gepaartem t Test ermittelt. Kon. = unstimulierte Kontrolle. n=3.

Zusammenfassend konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass durch TNF- α eine IL-12p70 Erhöhung stattfindet. Die Nachinkubation mit LPS + TNF- α zeigte einen vielversprechenden Anstieg dieses Zytokins, welcher jedoch SphK1-/S1P_i-unspezifisch

ist. Nach der CpG + TNF- α -Vorstimulation war kein Effekt auf IL-12p70 sichtbar, obwohl die IL-6 Kontrollmessung erwartete Ergebnisse lieferte.

4.1.2 Analyse der TNF- α -Wirksamkeit auf die TRAF2-Ubiquitinierung, die IL-6 Sekretion und Apoptose in murinen KM-DCs

Da im vorherigen Abschnitt durch TNF- α eher unterschiedliche Effekte auftraten, sollten im Folgenden die Eigenschaften der durch TNF- α hervorgerufenen zellulären Vorgänge genauer untersucht werden.

Nach Stimulation der Zellen durch TNF- α wird bekanntlich TRAF2 aktiviert und leitet die Lysin Rest(K)63-verlinkte Polyubiquitinierung des RIP1 ein. Da RIP1 und TRAF2 als ein Komplex in der Zelle vorliegen, wurde lediglich TRAF2 aus dem Zelllysate immunpräzipitiert und die Polyubiquitinierung durch einen anti-K63-Ubiquitin-Antikörper mittels eines speziell etablierten K63-Ubiquitin Blots nachgewiesen. Als Kontrolle wurde immunpräzipitiertes TRAF2 im Western Blot analysiert.

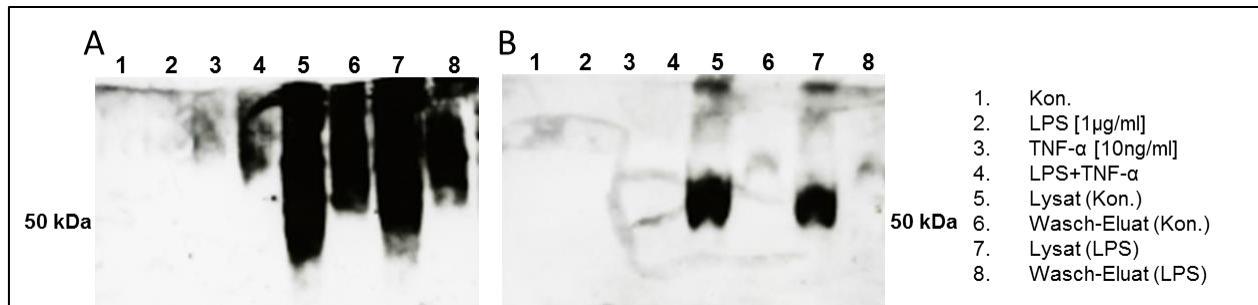


Abbildung 8: Immunpräzipitation von TRAF2 und anschließender K63-Ubiquitin Blot bzw. Western Blot von TRAF2 aus stimulierten WT-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden mit 1 µg/ml LPS, 10 ng/ml TNF- α oder mit beiden Stimulanzien für 10 min inkubiert oder unstimuliert gelassen (Kon.). Die Zellen wurden mittels RIPA-Puffer (versetzt mit 150 mM NaCl und 1%SDS) und Ultraschallbehandlung lysiert sowie TRAF2 immunpräzipitiert. Dann wurden die Proben entweder für den K63-Ubiquitin Blot in (A) oder für ein Western Blot von TRAF2 in (B) verwendet. Lysate vor der Immunpräzipitation sowie Wasch-Eluate während der Immunpräzipitation wurden zur Kontrolle aufgetragen. 10 µg Protein der jeweiligen Probe wurden auf 10%ige SDS-Gele beladen und belichtet wurde für 3 min. n=1.

Sowohl die alleinige Stimulation mit TNF- α als auch die Ko-Inkubation mit LPS lieferte einen schwachen, dennoch klar erkennbaren TRAF2-abhängigen K63-Ubiquitin-Nachweis, welcher nach LPS + TNF- α stärker ist als durch TNF- α alleine (**Abbildung 8 A**). Man erkennt, dass in den Lysat-Kontrollen, die noch vor der Immunpräzipitation abgenommen wurden, eine sehr starke K63-Ubiquitin-Färbung detektiert wurde. Eben nur aus diesen Proben konnte auch TRAF2 durch den anti-TRAF2-Antikörper nachgewiesen werden (**Abbildung 8 B**). Immunpräzipitiertes TRAF2 nach TNF- α - und LPS + TNF- α -Stimulation war demnach nicht eindeutig nachweisbar gewesen, dennoch fand vermutlich eine K63-Polyubiquitinierung des am Komplex assoziierten RIP1 statt.

Des Weiteren sollte die IL-6 Produktion durch eine Ko-Stimulation von TNF- α mit IL-1 β oder IFN- γ in murinen KM-DCs überprüft werden.

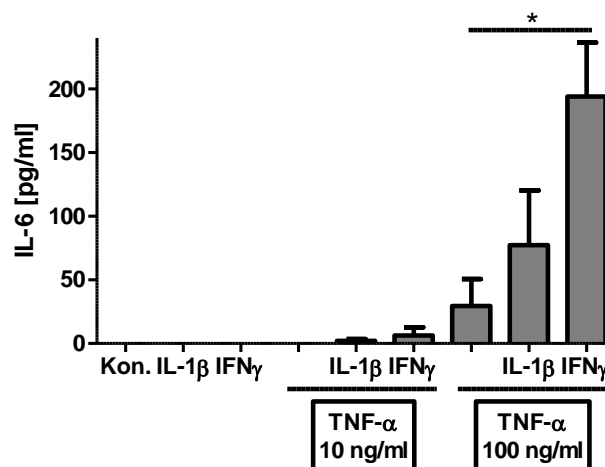


Abbildung 9: IL-6 Sekretion aus stimulierten WT-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden entweder einzeln mit 10 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml IFN- γ , 10 oder 100 ng/ml TNF- α oder in Kombination für 20 h stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurde die IL-6 Konzentration aus dem Überstand mittels ELISA gemessen. Statistische Signifikanz wurde per gepaartem t Test ermittelt. Kon. = unstimulierte Kontrolle. n=3.

Tatsächlich hatte die TNF- α -Stimulation von 10 ng/ml sehr geringen Einfluss auf die IL-6 Menge verglichen zu 100 ng/ml TNF- α (**Abbildung 9**). Die Ko-Inkubation durch IFN- γ lieferte einen signifikant höheren IL-6 Anstieg als durch TNF- α allein.

Da an dem TRAF2-Komplex entschieden wird, ob die Zellen überleben und inflammatorische Signalwege initiieren oder in die Apoptose gehen, sollten stimulierte und spät apoptotische/tote DCs mittels FACS-Analyse untersucht werden. SphK1^{-/-}-Zellen dienten als Kontrolle. Es wurden stimulierte Zellen aus den Ko-Inkubationen mit TNF- α herangezogen. Als Positiv-Kontrolle für die späte Apoptose/Zelltod dienten Zellproben, welche mit 10 μ M des PKC-Inhibitors, Staurosporin, für 4 h inkubiert wurden.

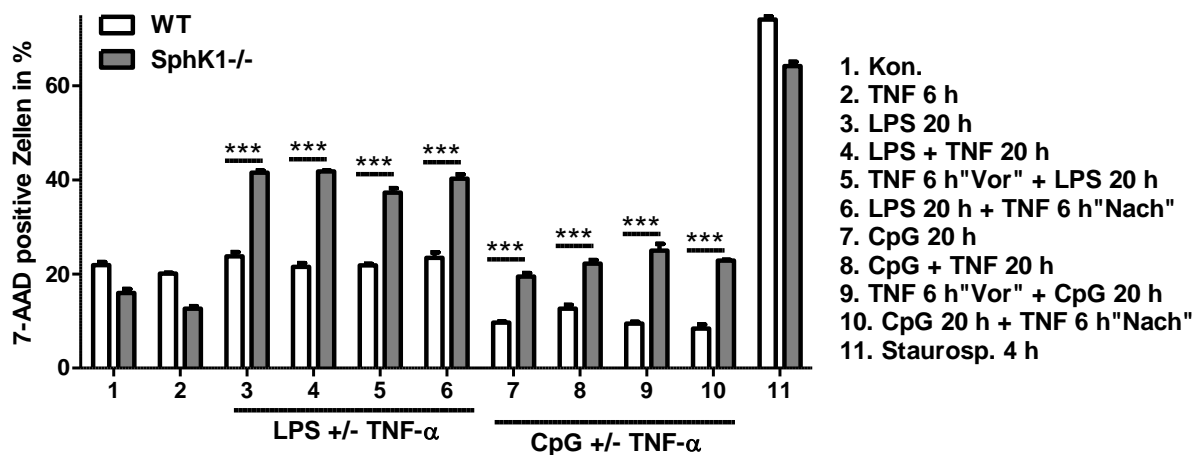


Abbildung 10: FACS Analyse der 7-AAD-positiven stimulierten WT- und SphK1^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden mit 10 ng/ml TNF- α (TNF), 1 μ g/ml LPS, 2,5 μ M CpG oder mit 10 μ M Staurosporin (Staurosp.) für 20 oder 4 h inkubiert. Die Zellen wurden mit 7-AAD markiert, im FACS gemessen und prozentuell aufgetragen. Statistische Signifikanz wurde per 2way ANOVA ermittelt. Kon. = unstimulierte Kontrolle, „Vor“ = mit TNF- α wurde für 6h vorstimuliert und danach mit LPS oder CpG für 20 h weiterstimuliert, „Nach“ = zunächst wurde mit LPS oder CpG für 20 h stimuliert und danach mit TNF- α für 6h weiter inkubiert. n=3.

Bei Stimulation mit LPS oder CpG wurden auffällig mehr spät apoptotische/tote (7-AAD-positiv) Zellen aus SphK1^{-/-}-Mäusen quantifiziert als aus WT-Mäusen (**Abbildung 10**). Diese Ergebnisse bestätigen Arbeiten von Limaye et al., welche nachweisen, dass durch die SphK1/S1P₆/S1PR₁-Achse nach Zellstimulation ein Überlebenssignal generiert wird (Limaye et al., 2005). Die Ko-Stimulationen durch TNF- α lieferten dagegen keine Hinweise auf verstärktes Zellüberleben verglichen mit alleinigen

Inkubationen durch LPS oder CpG. Durch die Gabe von CpG sterben die Zellen zu einem deutlich geringeren Prozentsatz als durch LPS.

Zusammenfassend ergaben die Zytokin-Messungen als Indikatoren einer möglichen TRAF2-TRAF6-Interaktion keine eindeutigen Ergebnisse. Zudem trat ein SphK1-/S1P_i-unspezifischer IL-12p70 Effekt auf. Durch die Überprüfung der zu diesem Zweck verwendeten TNF- α -Stimulation auf dessen zelluläre Ereignisse konnte zum einen eine erste TRAF2-abhängige RIP1-K63-Polyubiquitinierung und zum anderen eine stärkere IL-6 Induktion durch 100 ng/ml TNF- α + IFN- γ in murinen KM-DCs gezeigt werden. Eine verminderte Apoptose durch die Stimulation mit TNF- α blieb aus. Aufgrund dieser kontroversen Ergebnisse wurde der Fokus dieser Arbeit im Folgenden verstärkt auf die Aufklärung von S1P_e-reduzierenden Effekten und Regulation S1P metabolisierender Enzyme gerichtet.

4.2 Analyse einer zeitabhängigen S1P_e-induzierten IL-12p35- und IL-12p70-Reduktion und Austestung von S1P-neutralisierenden Spiegelmeren

Die hemmende Wirkung des exogen zugegebenen S1P auf LPS-stimulierte DCs wurde lediglich nach 20 h Zell-Inkubation gezeigt. Es ist jedoch vorteilhaft sowohl die alleinige LPS-Stimulation als auch eben diese S1P-vermittelte Wirkung nach unterschiedlichen Zeitintervallen zu untersuchen, um die bestmögliche Inkubationszeit der DCs zur effektiven Produktion der Zytokine herauszufinden. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten wurden als Vorbefunde zur Analyse und Austestung der S1P-neutralisierenden Spiegelmere in DCs verwendet. Diese Spiegelmere sind als Spiegelbilder (L-Stereoisomere) der RNA-Oligonucleotide strukturiert. Sie können aufgrund ihrer ausgebildeten drei-dimensionalen Strukturen, ähnlich wie Antikörper, spezifische Bindungen eingehen. Die Firma NOXXON hat freundlicherweise Proben der Spiegelmere bereitgestellt, welche in murinen KM-DCs -auf Basis der Erkenntnis über die S1P-induzierte IL-12p70 Hemmung- getestet werden sollten.

4.2.1 Untersuchungen zu zeitabhängigen Wirkungen des extrazellulären S1P auf die IL-12p35- und IL-12p70-Produktion

In diesem Abschnitt wurde zunächst der schon bekannte Befund bestätigt, in welchem die KM-DCs aus murinen SphK1^{-/-}-C57BL/6-Weibchen signifikant höhere IL-12p70 Konzentrationen nach der LPS-Stimulation produzieren als WT-Zellen (**Abbildung 11 A**). Dieser Befund wurde zusätzlich vervollständigt und um die Erkenntnis erweitert, dass nach einer CpG-Stimulation nur die KM-DCs aus murinen SphK1^{-/-}-BALB/c-Weibchen einen IL-12p70 Anstieg im Vergleich zum jeweiligen WT aufweisen (**Abbildung 11 B**).

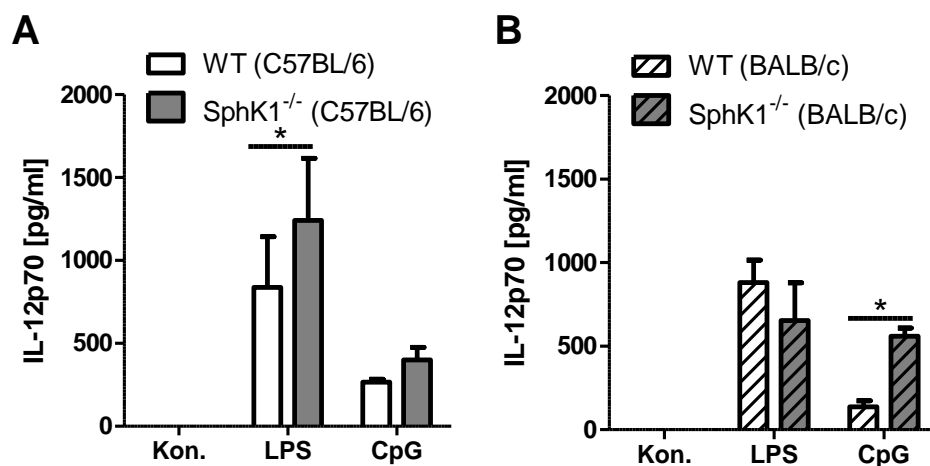


Abbildung 11: IL-12p70 Sekretion aus stimulierten WT- und SphK1^{-/-}-KM-DCs aus C57BL/6 und BALB/c-Mäusen im Vergleich.

Differenzierte KM-DCs wurden mit 1 µg/ml LPS oder 2,5 µM CpG stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurde die IL-12p70 Konzentration aus dem Überstand mittels ELISA gemessen. Statistische Signifikanz wurde per gepaartem t Test ermittelt. Kon. = unstimulierte Kontrolle. n=3.

Weiterhin war es notwendig die Zeitabhängigkeit der LPS-Stimulation auf die IL-12p35 mRNA-Expression und IL-12p70 Produktion durch KM-DCs zu untersuchen.

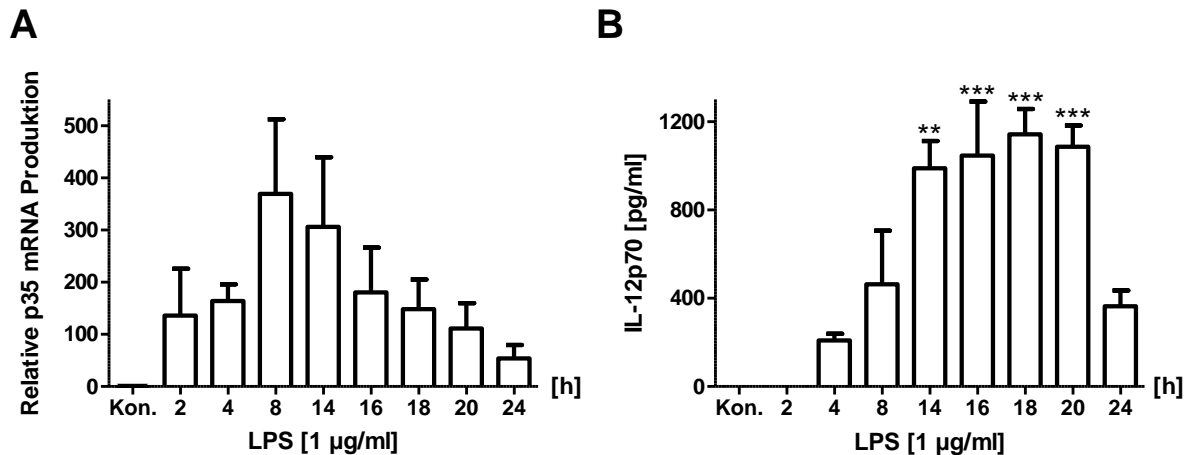


Abbildung 12: IL-12p35 mRNA-Produktion und IL-12p70 Sekretion aus stimulierten WT-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden mit 1 µg/ml LPS für unterschiedliche Zeiträume stimuliert. In **(A)** wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit die Gesamt-RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Realtime-PCR auf die Expression von IL-12p35 hin untersucht. Als Referenzgen wurde die 18S RNA gemessen. Die IL-12p35 Werte wurden sowohl auf die 18S RNA als auch auf die interne unstimulierte Kontrolle (Kon.) normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. In **(B)** wurden die Überstände für die Messung der IL-12p70 Konzentration mittels ELISA genutzt. Statistische Signifikanz wurde per 1way ANOVA ermittelt und als * im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kon.) aufgetragen. n=3.

LPS erzielte nach 8 h Stimulation der KM-DCs die höchste IL-12p35 mRNA-Produktion wenn auf die unstimulierten Werte normiert wurde (**Abbildung 12 A**). Dagegen war die LPS-Stimulationsdauer von 18 h für die höchste IL-12p70 Produktion und Sekretion ausschlaggebend (**Abbildung 12 B**). Die eben hervorgehobenen Simulationszeiten waren der Ausgangspunkt für alle weiteren nachfolgenden Planungen der Experimente.

Aus einem vorangegangenen dosis-abhängigen Versuch wurde ermittelt, dass S1P sowohl in der Konzentration von 250 nM als auch 1 µM zusammen mit 1 µg/ml LPS eine ähnliche IL-12p70 Reduktion erreicht (Daten nicht gezeigt). In den nächsten Experimenten sollte zwischen diesen beiden Konzentrationen von S1P sowohl auf Ebene der IL-12p35 mRNA als auch auf Proteinebene von IL-12p70 sowie in der Sekretion von IL-6 zeitabhängig verglichen werden.

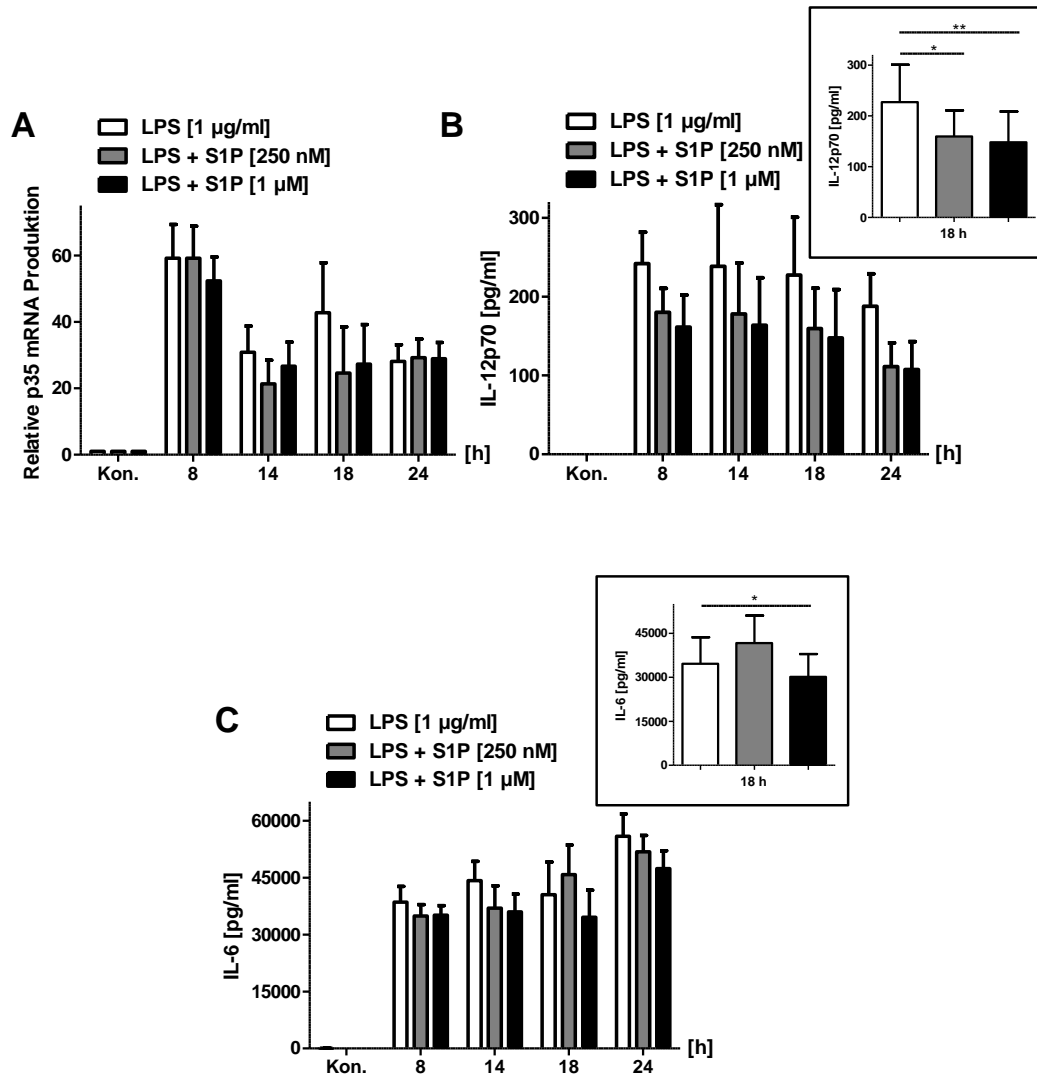


Abbildung 13: IL-12p35 mRNA-Expression sowie IL-12p70- und IL-6 Sekretion aus stimulierten WT-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs wurden mit 1 µg/ml LPS oder LPS in Kombination mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von S1P für unterschiedliche Zeiträume stimuliert. In (A) wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit die Gesamt-RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Realtime-PCR auf die Expression von IL-12p35 hin untersucht. Als Referenzen wurde GAPDH gemessen. Die IL-12p35 Werte wurden sowohl auf GAPDH als auch auf die interne unstimulierte Kontrolle (Kon.) normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. $n=3-4$. In (B) und (C) wurden die Überstände für die Messung der Zytokin-Konzentrationen, IL-12p70 $n=4$ und IL-6 $n=3-5$, mittels ELISA genutzt. Zusätzlich wurden die 18 h-Werte aus (B) oder (C) extrahiert und als Kästchen dargestellt. Statistische Signifikanz wurde per 1way ANOVA ermittelt.

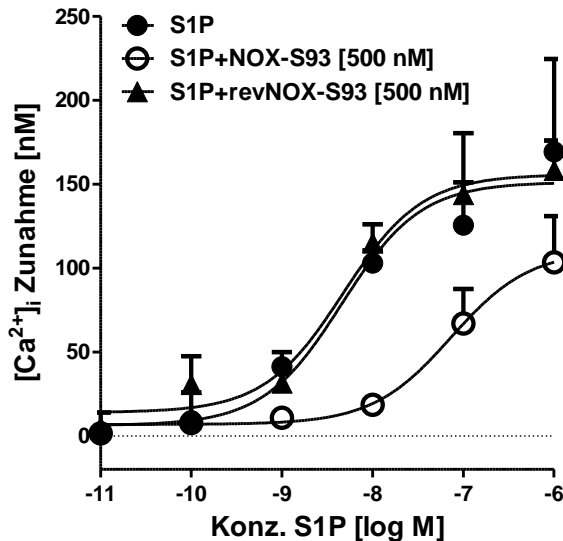
Die unterschiedlichen Konzentrationen von S1P hatten sich in ihrer Hemmung auf die LPS-induzierte IL-12p35 Expression nur minimal nach 8 und 14 h Stimulation

voneinander unterschieden (**Abbildung 13 A**). Der reduzierende Effekt durch beide Konzentrationen von S1P war nach 18 h Inkubation am größten. Des Weiteren waren auf Ebene der IL-12p70 Sekretion ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der beiden S1P-Konzentrationen erkennbar (**Abbildung 13 B**). Der Hemmeffekt durch beide verwendeten S1P-Mengen erhöhte sich bis zur 24 h Stimulation. Das Zytokin IL-6 wurde in hohen Mengen durch die stimulierten DCs produziert (**Abbildung 13 C**). Die Menge dieses Zytokins steigt bis zu 24 h Inkubation stetig an. Obwohl erwartet wurde, dass das exogen zugegebene S1P in der Konzentration von 1 μ M in die Zelle gelangt und womöglich die IL-6 Expression und Produktion positiv beeinflussen kann, konnte der positive Effekt geringfügig für die Ko-Inkubation mit 250 nM S1P nach 18 h bestätigt werden. Hingegen wurde ein signifikanter Hemmeffekt auf die IL-12p70 Sekretion durch beide Konzentrationen von S1P nach 18 h Stimulation verursacht (**Abbildung 13 B Kästchen**).

Diese Ergebnisse der gründlichen Zeitanalyse durch die S1P-Ko-Inkubation dienten als Basis für die nachfolgenden Austestungen der S1P-neutralisierenden Spiegelmere.

4.2.2 Austestung der S1P-Spiegelmere mittels Calcium- und Zytokinmessungen

Ein erster Test zur Nutzung der Spiegelmere wurde mittels einer Calciumkonzentrationsmessung aus HEK293-Zellen durchgeführt. Es ist bekannt, dass sowohl extra- als auch intrazelluläres S1P die intrazelluläre Calcium-Mobilisierung verstärken kann (Hopson et al., 2011). Dabei galt es zu überprüfen, ob und ab welcher S1P-Konzentration die S1P-neutralisierenden Spiegelmere (NOX-S93) einen S1P-induzierten intrazellulären Calcium-Anstieg hemmen. Um einen direkten Einfluss des Spiegelmers auf die Messung auszuschließen, wurde ein intaktes Spiegelmer (revNOX-S93) als Kontrolle benutzt.



EC₅₀:

S1P	4,6 nM
S1P + NOX-S93 [500nM]	73 nM
S1P + revNOX-S93 [500nM]	4,7 nM

Abbildung 14: Calcium-Zunahme durch Zugabe von S1P in Kombination mit den Spiegelmeren in HEK293-Zellen.

Mit Fura2-AM beladene HEK293-Zellen wurden mit S1P in Konzentrationen zwischen 0,01 μ M und 1000 μ M oder mit S1P in Kombination mit dem S1P-Spiegelmer (NOX-S93) oder dessen negative Kontrolle (revNOX-S93) stimuliert. Die Calciumkonzentrationen wurden am Spektrofluorometer gemessen. n=2.

Es konnte bestätigt werden, dass das S1P-Spiegelmer im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit S1P oder dessen negativen Kontrolle die intrazelluläre Calcium-Zunahme abmildert. Der EC₅₀ für das S1P-Spiegelmer liegt bei 73 nM.

Um die S1P-neutralisierenden Spiegelmere folgerichtig einzusetzen, sollte als Richtwert ein 10-facher Überschuss des Spiegelmers gegenüber der S1P-Menge eingesetzt werden. KM-DCs wurden mit LPS und den Spiegelmeren zunächst in deren unterschiedlichen Konzentrationen für 18 h inkubiert und IL-12p70 mittels ELISA quantifiziert. Dabei sollte das endogen gebildete und nach außen transportierte S1P durch das Spiegelmer abgefangen werden, so dass S1P an der Bindung zum S1PR₁ gehindert wird. Somit wurde eine höhere IL-12p70 Produktion erwartet (**Abbildung 15 A**). Zum anderen wurde zusammen mit exogenem S1P inkubiert und daraufhin untersucht, ob der hemmende Effekt von S1P durch das S1P-Spiegelmer aufgehoben oder abgemildert werden kann (**Abbildung 15 B**).

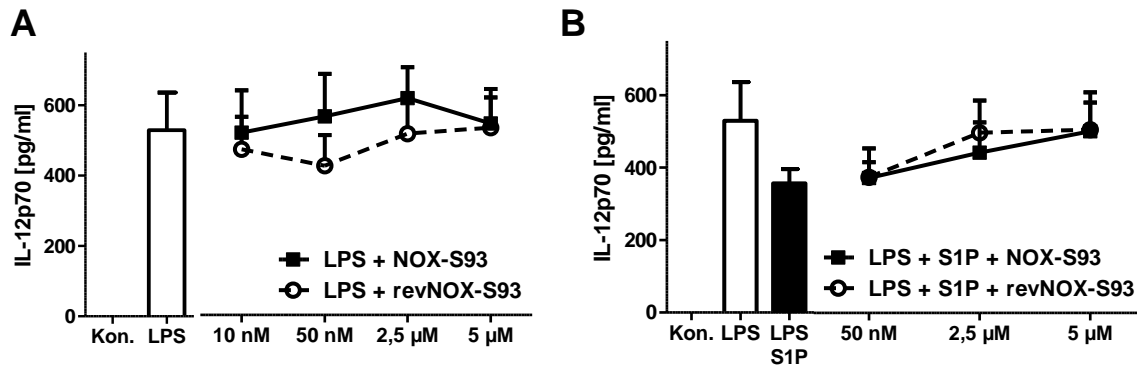


Abbildung 15: IL-12p70 Sekretion aus WT-KM-DCs, welche mit den S1P-Spiegelmeren inkubiert wurden.

Differenzierte KM-DCs wurden in (A) mit 1 µg/ml LPS oder LPS zusammen mit dem S1P-Spiegelmer (NOX-S93) sowie dessen negative Kontrolle (revNOX-S93) in den jeweiligen Konzentrationen für 18 h inkubiert. In (B) wurde zusätzlich mit 1 µg/ml LPS und 250 nM S1P oder zusammen mit den Spiegelmeren in den angegebenen Konzentrationen für 18h inkubiert. Zur Messung der IL-12p70 Konzentration aus den Überständen wurde ein ELISA durchgeführt. Kon. = unbehandelte Kontrolle. n=3.

Die Produktion von IL-12p70 konnte durch steigende Konzentrationen des S1P-Spiegelmers bis zu 2,5 µM leicht angehoben werden (**Abbildung 15 A**). Eine Konzentration von 5 µM bewirkte keine Effekte, da die Inkubation mit der Spiegelmer-Kontrolle gleiche IL-12p70 Mengen hervorbrachte. Die Reduktion der LPS-vermittelten IL-12p70 Produktion durch S1P wurde durch Zugabe des Spiegelmers schrittweise abgemildert (**Abbildung 15 B**). Jedoch verlief die Kurve der IL-12p70 Produktion aus den Kontrollproben mit revNOX-S93 nach sehr ähnlichem Muster.

Aufgrund dieser relativ schwachen Effekte des S1P-Spiegelmers sollte die IL-12p70 Produktion durch zusätzliche Gabe von IFN-γ verstärkt werden, um auf diese Weise bessere Resultate durch S1P-Spiegelmere zu erzielen. In der letzten Austestung der S1P-Spiegelmere auf die IL-12p70 Wirkung wurde folglich zusätzlich mit IFN-γ stimuliert.

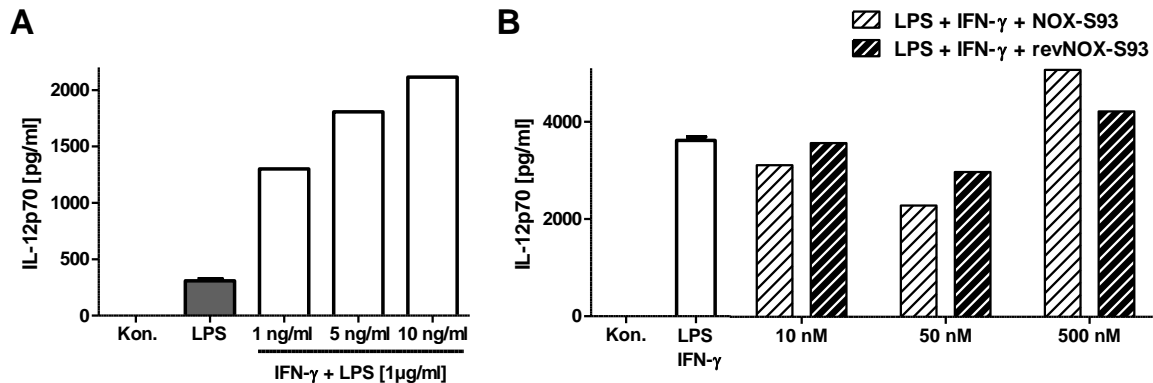


Abbildung 16: IL-12p70 Sekretion aus WT-KM-DCs, welche mit S1P-Spiegelmeren in Kombination mit LPS und IFN-γ inkubiert wurden.

Differenzierte KM-DCs wurden in (A) mit 1 µg/ml LPS oder LPS zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN-γ für 18 h inkubiert. n=1-3. In (B) wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS und 10 ng/ml IFN-γ oder zusammen mit dem S1P-Spiegelmer (NOX-S93) sowie dessen negative Kontrolle (revNOX-S93) in den jeweiligen Konzentrationen für 18 h inkubiert. n=1-2. Zur Messung der IL-12p70 Konzentration aus den Überständen wurde ein ELISA durchgeführt. Kon. = unbehandelte Kontrolle.

Schon die Konzentration von 1 ng/ml IFN-γ deutet auf eine mehr als zweifache Steigerung des produzierten IL-12p70 hin (**Abbildung 16 A**). Durch zunehmende Konzentrationen des IFN-γ in Kombination mit LPS stieg die Menge an IL-12p70 weiter an. Die Verwendung von 500 nM NOX-S93 lässt vermuten, dass hier das extrazelluläre S1P neutralisiert wurde bevor es an den Rezeptor binden konnte (**Abbildung 16 B**). Aus diesem Grund wurden höhere IL-12p70 Mengen sekretiert. Hierbei wurde die LPS-Konzentration reduziert, da IL-12p70 erst durch Zugabe der S1P-Spiegelmere das oberste Produktionslimit erreichen sollte.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass die höchsten IL-12p70 Mengen zum einen nach 18 h LPS-Stimulation produziert werden und zum anderen der Hemmeffekt durch S1P auch in dessen Konzentration von 250 nM erfolgen kann. Des Weiteren waren die durch diese verwendeten S1P-Konzentrationen hervorgerufenen Effekte auf IL-12p70 vs. IL-6 gegenläufig. Die Spiegelmere üben geringfügig positiv modulierende Wirkungen auf IL-12p70 aus und zwar sowohl nach LPS- als auch nach Ko-Stimulation mit IFN-γ. Diese Effekte müssen durch weiterführende Experimente genauer analysiert werden.

4.3 Auswirkungen der TLR-Stimulation auf die Regulation S1P metabolisierender Enzyme und die damit verbundene Induktion des Sterbens dendritischer Zellen

Aus der Literatur ergibt sich, dass die S1P Lyase bei Entzündungsprozessen angeborener und adaptiver Immunität modulierend sein kann. Es konnte aber nicht eindeutig gezeigt werden, wie die S1P Lyase während akuter und chronischer Entzündung reguliert wird. Aus diesem Grund sollte hier eine systematische Analyse der S1P Lyase-Expression erfolgen. Zum einen wurden die TLRs 1 bis 9 durch die entsprechenden Liganden in ihren unterschiedlichen Konzentrationen aktiviert und zum anderen wurde die S1P Lyase und andere S1P-generierende und -metabolisierende Enzyme in einer Langzeitkinetik untersucht. Auch die Konzentrationen der Sphingolipide, wie die von Sphingosin und S1P, und des pro-entzündlichen Zytokins IL-12p70 sollten hierbei analysiert werden. Parallel wurde unterschieden zwischen ausdifferenzierten aber nicht-aktivierten und TLR-stimulierten DCs im Hinblick auf ihre Expressions- und Produktionsmuster der Sphingolipid-Enzyme und Sphingolipide. Für diese Analysen wurden DCs herangezogen, da diese das angeborene Rezeptorrepertoire aktivieren und die adaptive Immunantwort einleiten. Die DCs werden jede 3 bis 4 Tage ersetzt (Kamath et al., 2002). Deswegen war es naheliegend zu untersuchen in wie weit die TLR-Aktivierung und die Sphingolipide zum aktivierungs-induzierten Zelltod („activation-induced cell death“ = AICD) (Wang et al., 2009) beitragen. Diese Ergebnisse wurden in einen Manuskript zusammengefasst und zur Publikation vorbereitet.

Des Weiteren wurde in diesem Abschnitt gezeigt, in wie weit das durch Tamoxifen induzierte Cre-Rekombinase-System Auswirkungen auf die S1P Lyase-Defizienz oder -Herunterregulation und auf die Konzentrationen von Sphingolipiden und IL-12p70 ausübt. Die so genannte S1P Lyase-Defizienz wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Gabe von Tamoxifen induziert und die noch vorhandene S1P Lyase-Expression sowie die Sphingolipide daraufhin untersucht. Auch wurde ausgetestet, ob die IL-12p70 Sekretion aus DCs durch Hemmung der S1P Lyase mit Hilfe von 4-Deoxypyridoxin beeinflusst wird.

4.3.1 Reduzierte Expression der S1P Lyase nach TLR-Aktivierung in KM-DCs

Mit GM-CSF ausdifferenzierte KM-DCs aus WT-Mäusen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von LPS stimuliert. Alternativ wurden die Zellen mit jeweils einer Konzentration eines jeden TLR-Liganden 1 - 9 für 18 Stunden behandelt. Dann wurde die durch RT-PCR gewonnene cDNA auf die Produktion der S1P Lyase (SPL) mittels Realtime-PCR oder semi-quantitativer PCR hin untersucht.

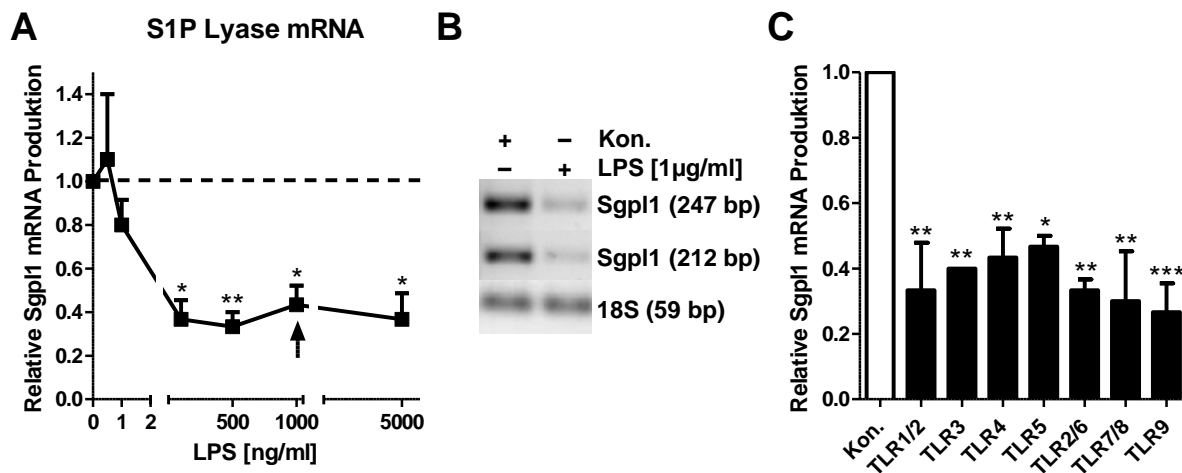


Abbildung 17: Reduzierte S1P Lyase-Expression nach TLR-Aktivierung.

KM-DCs wurden in **(A)** mit 0, 0,5, 1, 100, 500, 1000 und 5000 ng/ml LPS, in **(B)** mit 1 µg/ml LPS oder in **(C)** mit unterschiedlichen Toll-like Rezeptor-Liganden (TLR1/2: 1 µg/ml Pam3 CSK4, TLR3: 50 µg/ml Poly I:C, TLR4: 1 µg/ml LPS, TLR5: 10 µg/ml Flagellin, TLR2/6: 100 ng/ml Pam2 CSK4, TLR7/8: 1,57 µg/ml R848, TLR9: 9,62 µg/ml CpG) für 18 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA isoliert und in **(A)** und **(C)** die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Realtime-PCR auf die Expression von SPL hin untersucht. Als Referenzgen wurde CsnK2a2 gemessen. Die SPL-Werte wurden sowohl auf CsnK2a2 als auch auf die interne Kontrolle normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. In **(B)** wurde die Expression der S1P Lyase mittels zweier unterschiedlicher Primer Paare in einer semi-quantitativen PCR untersucht. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle (Kon.) und der jeweiligen stimulierten Probe wurde in **(A)** per T test und in **(C)** mittels 1way ANOVA ermittelt. Die gestrichelte Linie in **(A)** zeigt die SPL-Expression ohne LPS-Stimulation und der Pfeil deutet auf die LPS-Konzentration hin, welche in **(C)** verwendet wurde. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase. n=3.

Die Inkubation der Zellen mit LPS hat zu einer drastischen dosis-abhängigen Abnahme der S1P Lyase-Expression geführt, wenn auf die interne Medium-Kontrolle ohne Stimulation normalisiert wurde (**Abbildung 17 A**). Die S1P Lyase war schon nach

Zugabe von 1 ng/ml LPS zu 20% herunterreguliert. Weiterhin haben 100 – 5000 ng/ml LPS bewirkt, dass SPL verglichen zur Kontrolle zu etwa 70% signifikant verringert wurde. Die Assay Primer für die Realtime-PCR detektieren eine SPL-Region zwischen Exon 3 und 4. Da bei der Realtime-PCR post-transkriptionelle Modifikationen nicht berücksichtigt werden können und deswegen die Amplifikation der cDNA auch unspezifisch erfolgen kann, wurde die SPL-Expression durch eine semi-quantitative PCR bestätigt. Dabei wurden zwei spezifische Primer Paare gewählt, welche innerhalb der definierten pyridoxal-abhängigen konservierten Decarboxylasedomäne binden sollen. Diese wurde zwischen Exon 3 und 9 des SPL-Gens beschrieben (Ikeda et al., 2004a). Die Decarboxylasedomäne entspricht der Domäne für die Enzymaktivität der S1P Lyase. Die Primer Paare binden an zwei unterschiedlichen Regionen innerhalb dieser Domäne. Eine Amplifikation mit dem Primer Paar 1 lieferte ein 212 bp großes Produkt, welches einer Region zwischen Exon 8 und 10 entspricht. Das Primer Paar 2 generierte ein Produkt zwischen Exon 6 und 8 bestehend aus 247 bp. Im Vergleich zum 18S-Kontrollgen und zu den unbehandelten Zellen wurde nach LPS eine geringere Menge beider Amplikons detektiert (**Abbildung 17 B**). Da die DCs unterschiedliche TLRs auf ihrer Membran exprimieren (Kawai and Akira, 2010), wurde weiterhin durch Stimulation der TLRs 1 - 9 eine TLR-abhängige Regulation von SPL auf mRNA-Ebene untersucht. Die Inkubation der Zellen mit den unterschiedlichen TLR-Liganden in Konzentrationen nach Herstellerangaben bewirkte ebenfalls eine signifikante Verringerung von SPL von etwa 50 bis 70% (**Abbildung 17 C**).

Des Weiteren wurde die S1P Lyase-Expression nach Aktivierung eines jeden TLRs durch den entsprechenden Liganden in verschiedenen Konzentrationen überprüft. Es sollte hierbei aufgeklärt werden mit welcher Dosis der spezifischen TLR-Liganden die Hemmung von SPL beginnt. Das Ergebnis in **Abbildung 18** zeigt, dass obwohl sehr geringe Anfangskonzentrationen jedes TLR-Liganden verwendet wurden, schon hier eine signifikante Verringerung der SPL-Produktion detektiert werden konnte. Jedoch lieferten die höchsten Dosen der TLR-Liganden keine komplette Herunterregulation der S1P Lyase.

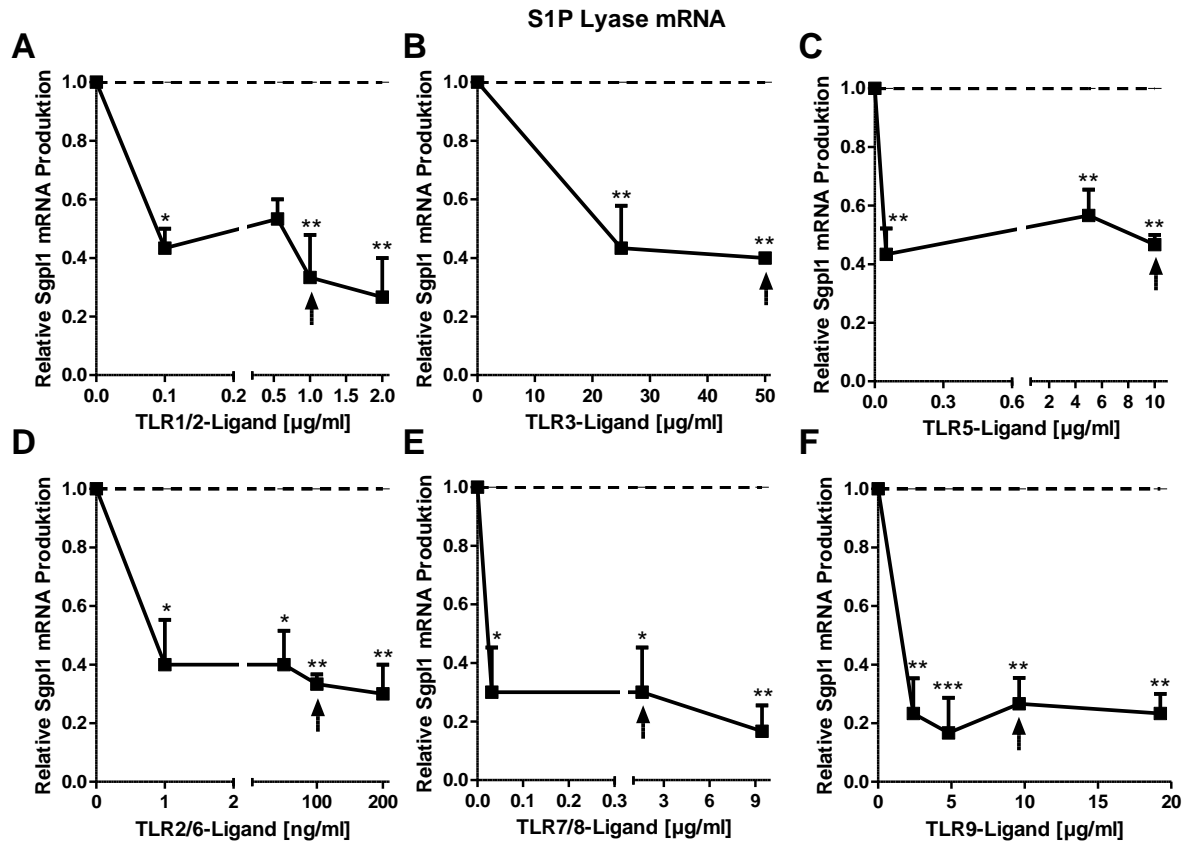


Abbildung 18: Verringerte S1P Lyase-Expression nach Aktivierung der TLRs 1 - 9 in unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Liganden.

KM-DCs wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von (A) Pam3 CSK4 (0, 0,1, 0,55, 1, 2 µg/ml), (B) Poly I:C (0, 25, 50 µg/ml), (C) Flagellin (0, 0,05, 5, 10 µg/ml), (D) Pam2 CSK4 (0, 1, 50, 100, 200 ng/ml), (E) R848 (0, 0,03, 1,57, 9,43 µg/ml) oder (F) CpG (0, 2,406, 4,811, 9,623, 19,245 µg/ml) für 18 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (gestrichelte Linie). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Realtime-PCR auf die Expression von SPL hin untersucht. Als Referenzgen wurde CsnK2a2 gemessen. Die SPL-Werte wurden sowohl auf CsnK2a2 als auch auf die interne Kontrolle normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle und der jeweiligen stimulierten Probe wurde mittels 1way ANOVA ermittelt. Der Pfeil deutet auf die TLR-Liganden Konzentration hin, welche in der **Abbildung 17 C** verwendet wurde. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase. n=3.

4.3.2 Produktion inflammatorischer Zytokine als Antwort auf die TLR-Stimulation

Nach Triggern eines oder mehrerer TLRs auf DCs wird die Entzündung auch durch die Produktion und Sekretion inflammatorischer Zytokine in Gang gesetzt. Hierbei spielen die Zytokine IL-12p70 und IL-23 eine wesentliche Rolle, da sie zur Differenzierung

unterschiedlicher T-Helferzellen beitragen und gegensätzliche Funktionen in Bezug auf Kanzerogenese aufweisen. Während das pro-entzündliche und anti-kanzerogene IL-12p70 die Th1-Differenzierung und IFN- γ Produktion induziert, ist IL-23 für die Th17-Differenzierung zuständig. Beide Zytokine teilen sich jedoch die p40-Untereinheit, welche entweder ein Heterodimer mit p35 formt, um IL-12p70 zu bilden oder ein Heterodimer mit p19 zur Produktion von IL-23 bildet. Da die S1P Lyase nach TLR-Aktivierung herunterreguliert wird, war die Überprüfung der Zytokinsekretion notwendig. Hierbei sollte festgestellt werden in wie weit DCs parallel zur SPL-Herunterregulation aktiviert werden. Nach Stimulation der KM-DCs mit unterschiedlich spezifischen TLR-Liganden oder steigenden Konzentrationen von LPS wurde die RNA isoliert und die revers transkribierte cDNA auf die Expression der beiden Untereinheiten von IL-12p70 durch Realtime-PCR analysiert.

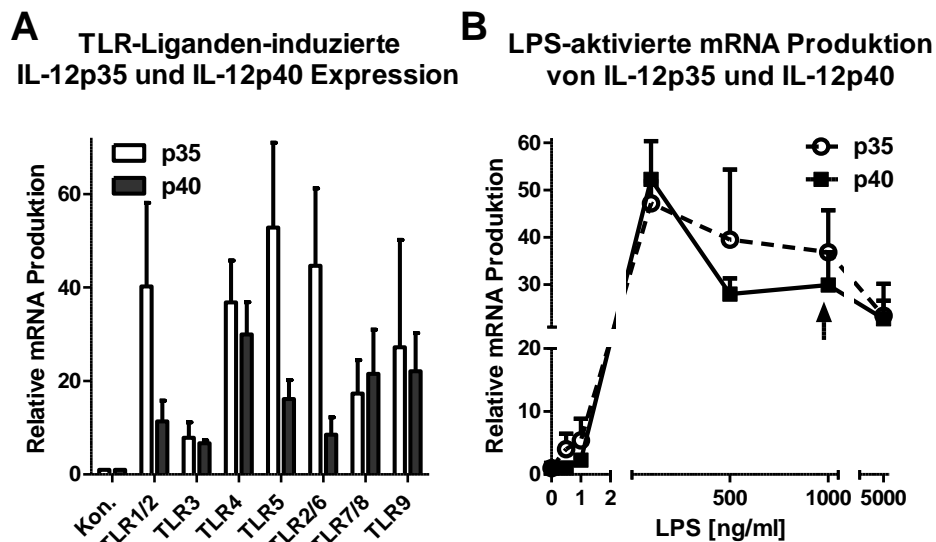


Abbildung 19: Expression von IL-12p35 und IL-12p40 nach Aktivierung der unterschiedlichen TLRs oder nach dosis-abhängiger TLR4-Stimulation.

KM-DCs wurden in (A) mit unterschiedlichen TLR-Liganden (siehe **Abbildung 17 C**) oder in (B) mit 0, 0,5, 1, 100, 500, 1000 und 5000 ng/ml LPS für 18 h stimuliert. IL-12p35 und IL-12p40 wurden mittels quantitativer Realtime-PCR auf ihre Expression hin untersucht. Als Referenzgen wurde CsnK2a2 gemessen. Die IL-12p35- und IL-12p40-Werte wurden sowohl auf CsnK2a2 als auch auf die interne Kontrolle (Kon.) normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. Der Pfeil in (B) deutet auf die LPS-Konzentration hin, welche in (A) verwendet wurde. n=3.

Aus der **Abbildung 19** ist ersichtlich, dass p35 und p40 nach TLR-Stimulation unterschiedlich reguliert werden. p40 wurde, zumindest nach Aktivierung der membranständigen TLRs (1/2, 5, 2/6), in geringeren Mengen produziert als p35. Nach Aktivierung der endosomalen TLRs (3, 7/8 und 9) hingegen wurden die beiden Untereinheiten in ähnlichem Verhältnis detektiert. TLR4 ist sowohl membranständig als auch auf Endosomen zu finden. Bei 500 bis 1000 ng/ml LPS war p35 gegenüber p40 erhöht. Nach Inkubation der Zellen in sehr geringen und hohen LPS-Dosen wurden jedoch p35 und p40 gleich stark exprimiert.

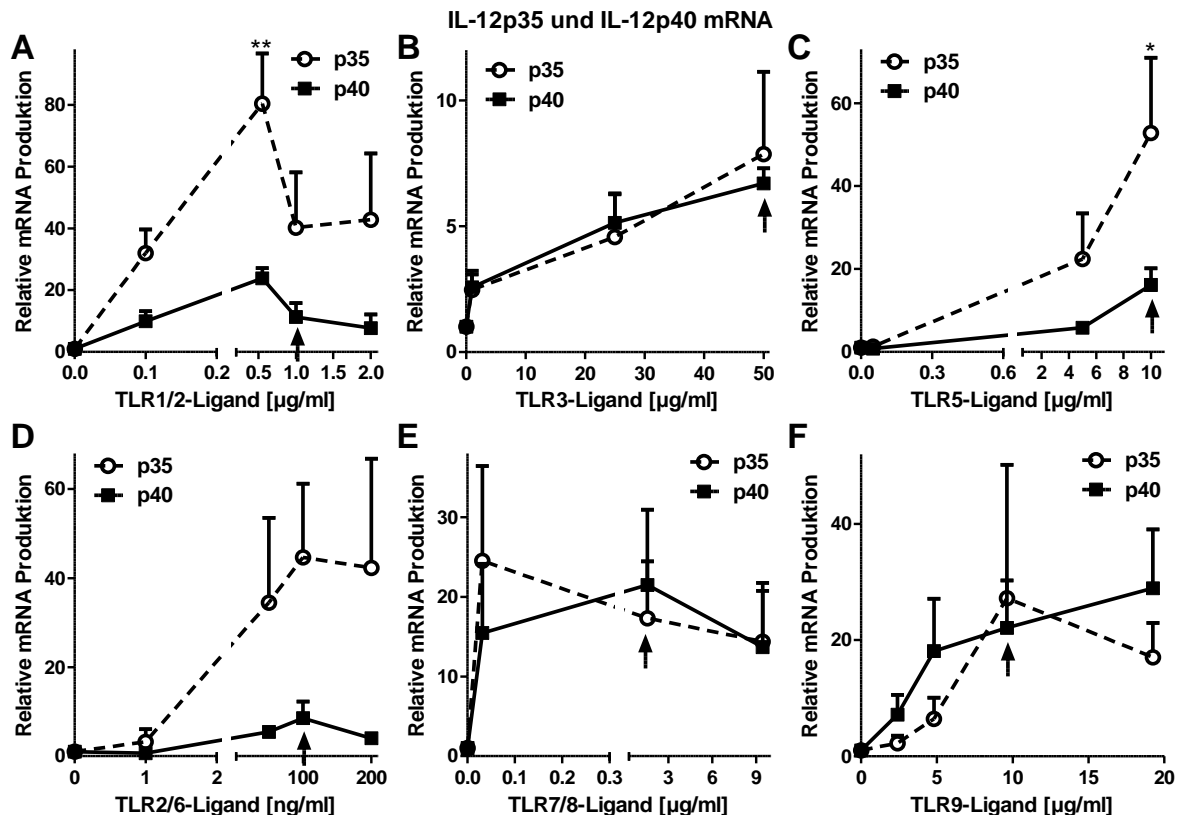


Abbildung 20: Expression von IL-12p35 und IL-12p40 nach Stimulation der unterschiedlichen TLRs in mehreren Konzentrationen der TLR-Liganden.

KM-DCs wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der jeweiligen TLR-Liganden (siehe **Abbildung 18**) für 18 h stimuliert. Die Expression von IL-12p35 und IL-12p40 wurde mittels quantitativer Realtime-PCR quantifiziert. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle und der jeweiligen stimulierten Probe wurde per 2way ANOVA ermittelt. Der Pfeil deutet auf die TLR-Liganden Konzentration hin, welche in der **Abbildung 19 A** verwendet wurde. $n=3$.

Die differentiellen Expressionseffekte beider Untereinheiten stachen im Hinblick auf die Aktivierung unterschiedlicher TLRs 1 - 9 in mehreren Konzentrationen deutlicher heraus (**Abbildung 20**): Wiederholt wurde beobachtet, dass weniger p40 als p35 nach Aktivierung membranständiger TLRs (1/2, 5, 2/6) exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu ergab die Simulation der endosomalen TLRs in den aufsteigenden Konzentrationen ihrer jeweiligen spezifischen Liganden eine vergleichbare Expression beider Untereinheiten.

Um die Auswirkungen der TLR-Stimulation auch auf Protein-Ebene zu untersuchen, wurden im Folgenden die Konzentrationen von IL-12p70 und IL-23 aus dem Überstand mittels ELISA gemessen.

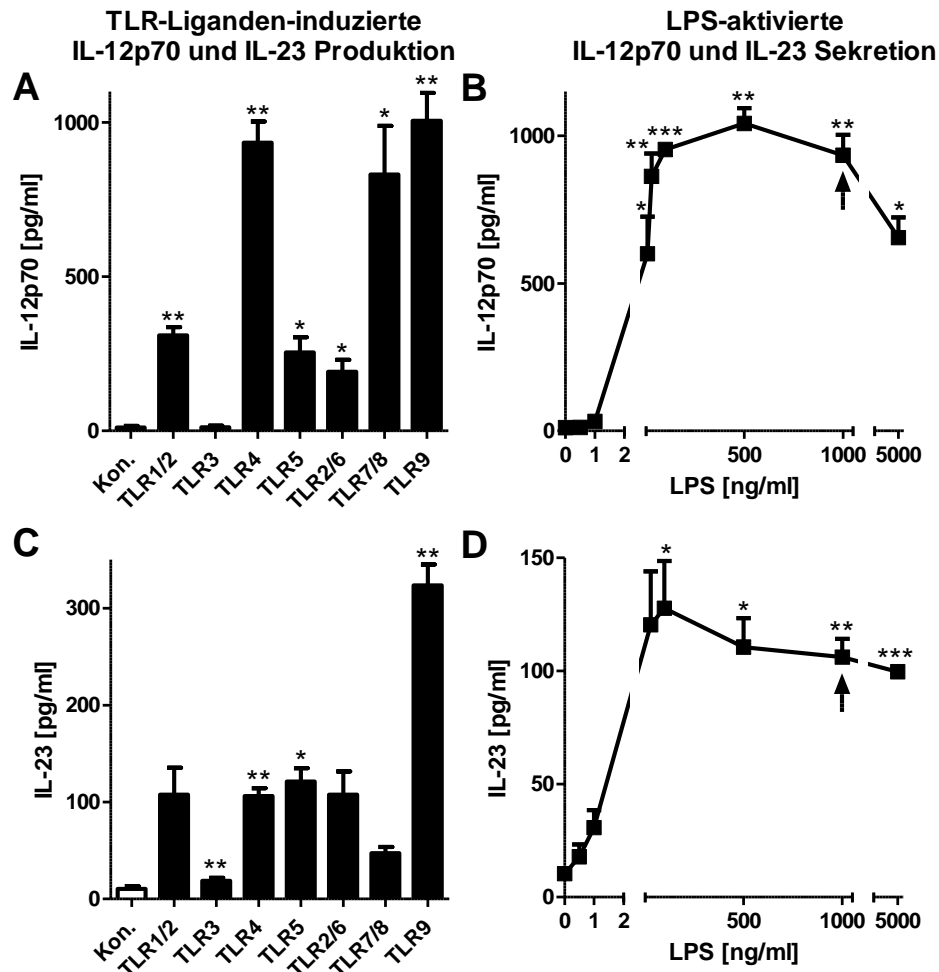


Abbildung 21: Produktion und Sekretion von IL-12p70 und IL-23.

KM-DCs wurden in (A) und (C) mit unterschiedlichen TLR-Liganden (siehe **Abbildung 17 C**) oder in (B) und (D) mit 0, 0,5, 1, 10, 30, 100, 500, 1000 und 5000 ng/ml LPS für 18 h stimuliert. Zur Messung der IL-12p70 Menge in (A) und (B) und IL-23 Konzentration in (C) und (D) aus den Überständen wurde jeweils ein ELISA durchgeführt. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle (Kon.) und der jeweiligen stimulierten Probe wurde per T test ermittelt. Der Pfeil in B und D deutet auf die TLR-Liganden Konzentration hin, welche in A und C verwendet wurde. n=3.

Die IL-12p70 Produktion nach Stimulation mit den spezifischen TLR-Liganden spiegelt das unterschiedliche Expressionsmuster der p35 und p40 mRNA wider (**Abbildung 21 A**). Diejenigen Zellen, welche einen starken Unterschied in der Expression der beiden Untereinheiten aufzeigten, produzierten auch weniger des Heterodimers auf Protein-Ebene. Dies war nach der Aktivierung der membranständigen TLRs (1/2, 5, 2/6) der Fall. Dagegen sekretierten endosomal aktivierte Zellen, mit Ausnahme des TLR3, höhere Mengen an IL-12p70. Bei der Dosis-Wirkungskurve nach LPS-TLR4-Stimulation

reichten schon 10 ng/ml LPS aus, um die Sekretion von IL-12p70 in einer Konzentration von über 500 pg/ml zu gewährleisten (**Abbildung 21 B**). Die höchsten Mengen an IL-12p70 wurden nach Gabe von 500 ng/ml LPS erreicht.

Für die gemessene IL-23 Produktion lässt sich allgemein feststellen, dass es gegenüber IL-12p70 in geringeren Mengen sekretiert wurde (**Abbildung 21 C und D**). Unter den unterschiedlichen TLRs bewirkte die Stimulation des TLR9 die höchste Produktion an IL-23. Des Weiteren konnte dieses Zytokin schon nach einer sehr geringen LPS-Dosis (30 - 100 ng/ml) in hohem Maße produziert werden. Die Dosis-Wirkungskurve von IL-23 verläuft ähnlich der von p40. Die Poly I:C-TLR3-Stimulation erfolgte vermutlich nicht induzierend, da sehr geringe Mengen an IL-12p70 und IL-23 detektiert wurden.

Weiterhin wurde die Zytokin-Produktion nach Stimulation der unterschiedlichen TLRs in aufsteigenden Konzentrationen untersucht. Die IL-12p70 Kurven aus der **Abbildung 22** korrelieren stark mit den p35-Expressionsmustern.

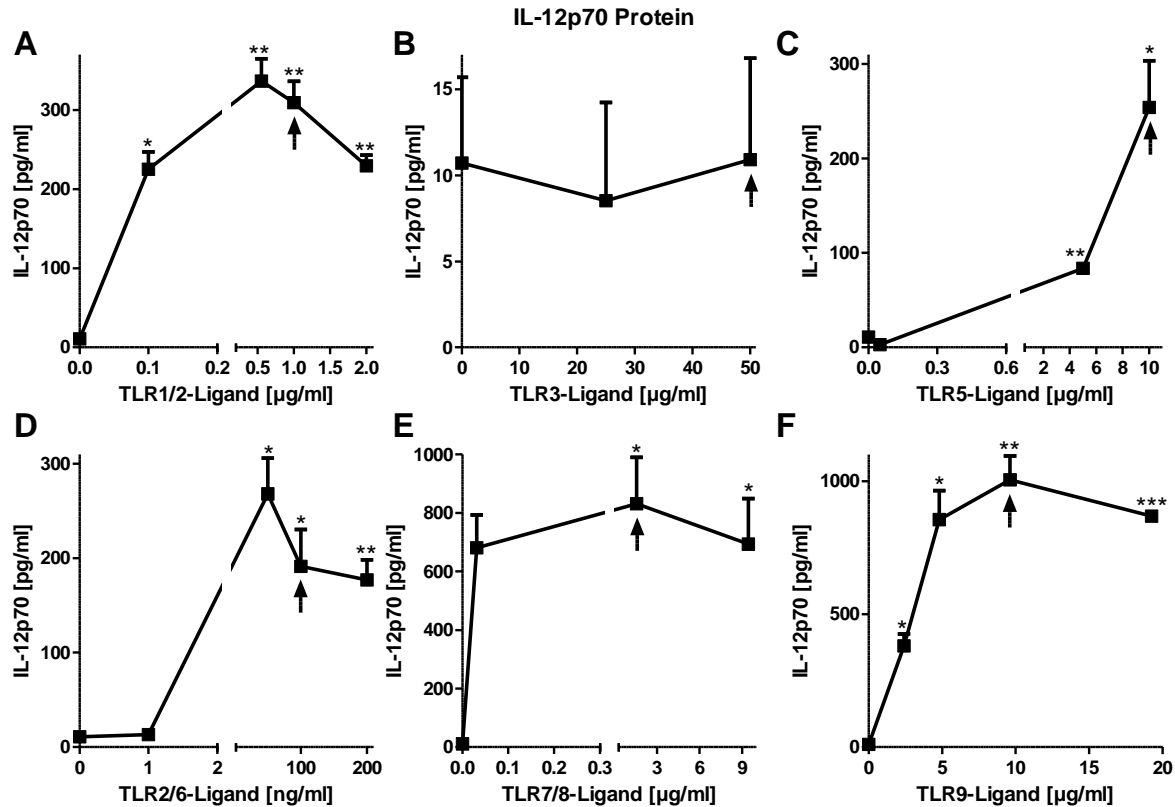


Abbildung 22: Produktion von IL-12p70 nach dosis-abhängiger Stimulation der jeweiligen TLRs.

KM-DCs wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der jeweiligen TLR-Liganden (siehe **Abbildung 18**) für 18 h stimuliert. Zur Messung der IL-12p70 Konzentration aus den Überständen wurde ein ELISA durchgeführt. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle und der jeweiligen stimulierten Probe wurde per T test ermittelt. Der Pfeil deutet auf die TLR-Liganden Konzentration hin, welche in **Abbildung 21 A** verwendet wurde. n=3.

Die detektierten IL-23 Mengen in der **Abbildung 23** verliefen in ihren Kurven ähnlich denen der p40-Profile aus der **Abbildung 20** mit Ausnahme der TLR7/8-Stimulation.

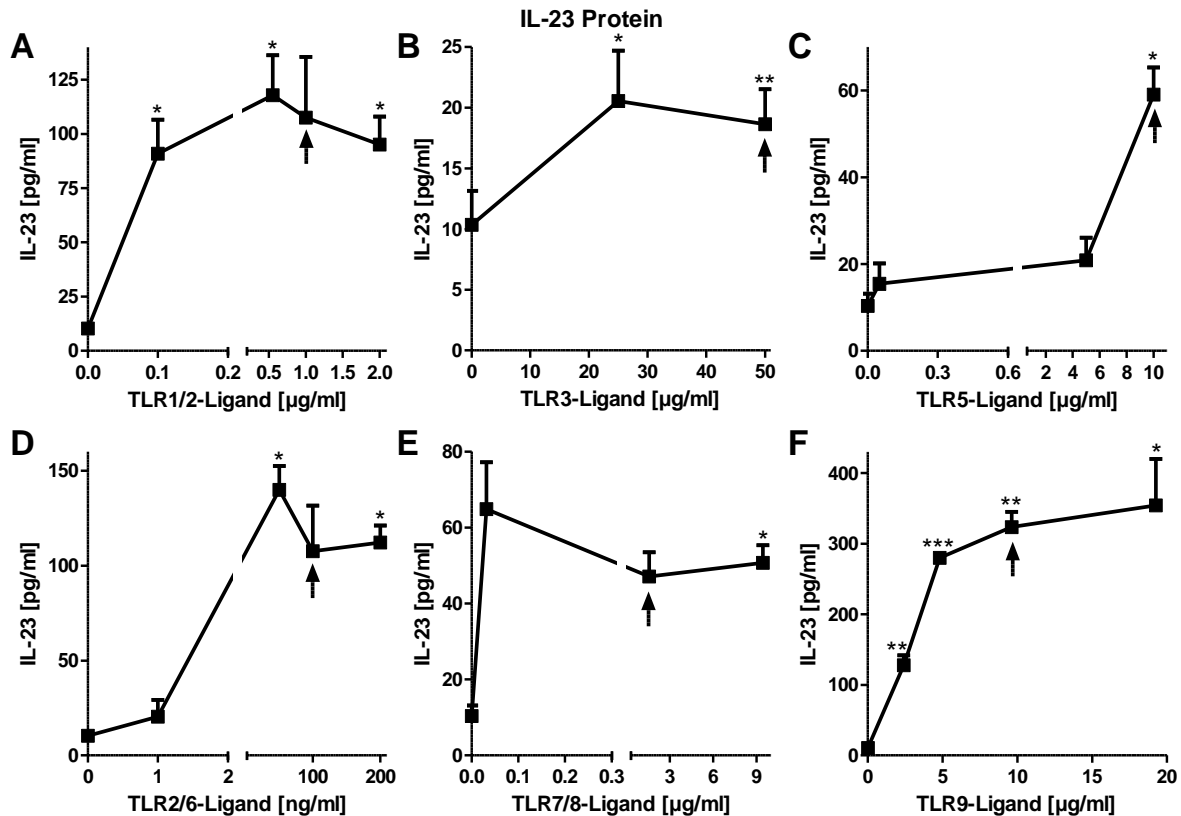


Abbildung 23: IL-23 Sekretion nach dosis-abhängiger Stimulation der unterschiedlichen TLRs.

KM-DCs wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der jeweiligen TLR-Liganden (siehe **Abbildung 18**) für 18 h stimuliert. Zur Messung der IL-23 Konzentration aus den Überständen wurde ein ELISA durchgeführt. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle und der jeweiligen stimulierten Probe wurde per T test ermittelt. Der Pfeil deutet auf die TLR-Liganden Konzentration hin, welche in **Abbildung 21 C** verwendet wurde. $n=3$.

Zusammengefasst konnte bestätigt werden, dass die TLR-induzierte Stimulation die DCs aktiviert und die Expression und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen nach sich zieht. Diese Entzündungsreaktion ist zudem assoziiert mit einer signifikanten S1P Lyase-Herunterregulation. Ergänzend sollte im nächsten Abschnitt im Wesentlichen untersucht werden, ob die Enzym-Hemmung auf mRNA-Ebene auch Folgen auf die Enzymaktivität der S1P Lyase sowie auf die Expression anderer S1P-generierender und -degradierender Enzyme hat. Zusätzlich wurden die Konzentrationen von Sphingosin und S1P gemessen.

4.3.3 Einfluss der Langzeit-Kultivierung dendritischer Zellen auf die Expression S1P-relevanter Enzyme sowie auf zellulären Gehalt der Sphingolipide

Bisher konnte gezeigt werden, dass die S1P Lyase auf mRNA-Ebene nach 18 Stunden TLR-Aktivierung signifikant herunterreguliert wird. Wie schon erwähnt, überleben die DCs 3 - 4 Tage, um wichtige immunologische Prozesse zu steuern. Es war weiterhin interessant zu beobachten wie die S1P Lyase nach einer längeren Inkubation sowohl ohne als auch mit Stimulanz reguliert wird. Hierzu wurden die Zellen insgesamt von 0 bis 72 Stunden inkubiert. Nach dem jeweiligen Stimulationszeitpunkt wurden die Zellen geerntet und für weitere Zwecke verwendet.

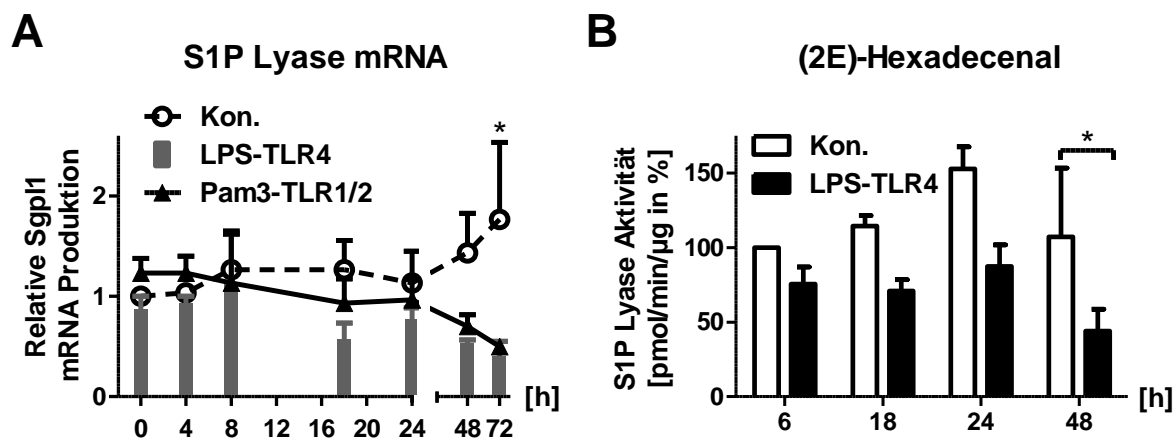


Abbildung 24: Produktion der S1P Lyase auf mRNA- und Enzymaktivitätsebene nach zeitabhängiger Aktivierung der KM-DCs.

Zellen wurden in (A) mit 1 µg/ml LPS oder 1 µg/ml Pam3 CSK4 für 0, 4, 8, 18, 24, 48 und 72 h oder in (B) nur mit LPS stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). In (A) wurde die SPL-Expression mittels quantitativer Realtime-PCR ermittelt. Die SPL-Werte wurden sowohl auf CsnK2a2 als auch auf die interne Kontrolle nach 0 oder 4 h Inkubation normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. n=3. In (B) wurde die Enzymaktivität von SPL mittels Messung der (2E)-Hexadecenal-Konzentrationen per Flüssigchromatographie bestimmt. Als Referenz wurde die interne Medium-Kontrolle nach 6 h Inkubation herangezogen. n=3-4. Signifikanzen zwischen der unbehandelten Kontrolle (Kon.) und der jeweiligen LPS-stimulierten Probe wurden per 2way ANOVA ermittelt. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase.

Die zeitlich-determinierte Analyse ergab, dass in unstimulierten Zellen die SPL-Expression annähernd stabil bis zu 24 h bleibt und danach ansteigt (**Abbildung 24 A**).

Die LPS-induzierten Zellen hingegen zeigten schon ab 8 h Stimulation einen stetigen Abfall von SPL, welcher durch die Pam3-TLR1/2-Stimulation ebenfalls detektiert werden konnte. Des Weiteren wurde die mRNA-Expression durch einen Enzymaktivitätsassay mittels Messung von (2E)-Hexadecenal verifiziert. Hexadecenal ist ein Produkt der S1P Lyase aus der Degradation von S1P. Eine Konzentrationsbestimmung von derivatisiertem Hexadecenal nach der Stimulation ermöglichte somit einen indirekten Zusammenhang zur spezifischen Enzym-Aktivität herzustellen (**Abbildung 24 B**). Die Messungen von (2E)-Hexadecenal erfolgten in freundlicher Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kleuser, der die etablierte Methode in seinem Labor im Jahr 2012 veröffentlichte (Lüth et al., 2012). In den unbehandelten Zellen ist die S1P Lyase-Aktivität von 6 bis 24 Stunden nach DC-Kultivierung –zeitversetzt zur mRNA– angestiegen. Im Gegensatz dazu wurde in den LPS-Stimulierten DCs eine geringere Enzym-Aktivität detektiert, welche nach 48 h Stimulation signifikant wurde.

Da nun die SPL-Herunterregulation durch die Enzymaktivitätsmessung bestätigt wurde, erfolgte zur Vervollständigung die anschließende Untersuchung anderer S1P-generierender und -metabolisierender Enzyme. Es sollte die Expression der beiden Sphingosinkinasen 1 und 2 (SphK1/2) sowie die der S1P Phosphatasen 1 und 2 (SPP1/2) nach der Kurz- und Langzeitinkubation mit und ohne LPS durch die Realtime-PCR analysiert werden.

Der **Abbildung 25** kann man entnehmen, dass die Stimulus-unbehandelten Zellen die Enzyme SphK1, SphK2 und SPP1 nach 72 h annähernd gleich exprimieren. In der Literatur wird beschrieben, dass SphK1 nach Stimulation der Zellen sehr schnell hochreguliert wird. Dies konnte in unseren Experimenten jedoch sowohl für die unbehandelten als auch für die LPS-stimulierten Zellen beobachtet werden (**Abbildung 25 A**). Zusätzlich war die Hochregulation von SphK1 aus den LPS-behandelten Zellen stärker ausgeprägt und nach 72 h Stimulation konnte eine 30-fache Erhöhung dieses Enzyms beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurden SphK2 und S1P Phosphatase1 nach der DC-Stimulation zeitlich sehr früh (nach 4 h) herunterreguliert. Die mRNA der SphK2 erholte sich wieder, die der SPP1 verblieb jedoch auf dem niedrigen Expressionslevel über die Inkubationszeit hinweg (**Abbildung 25 B und C**).

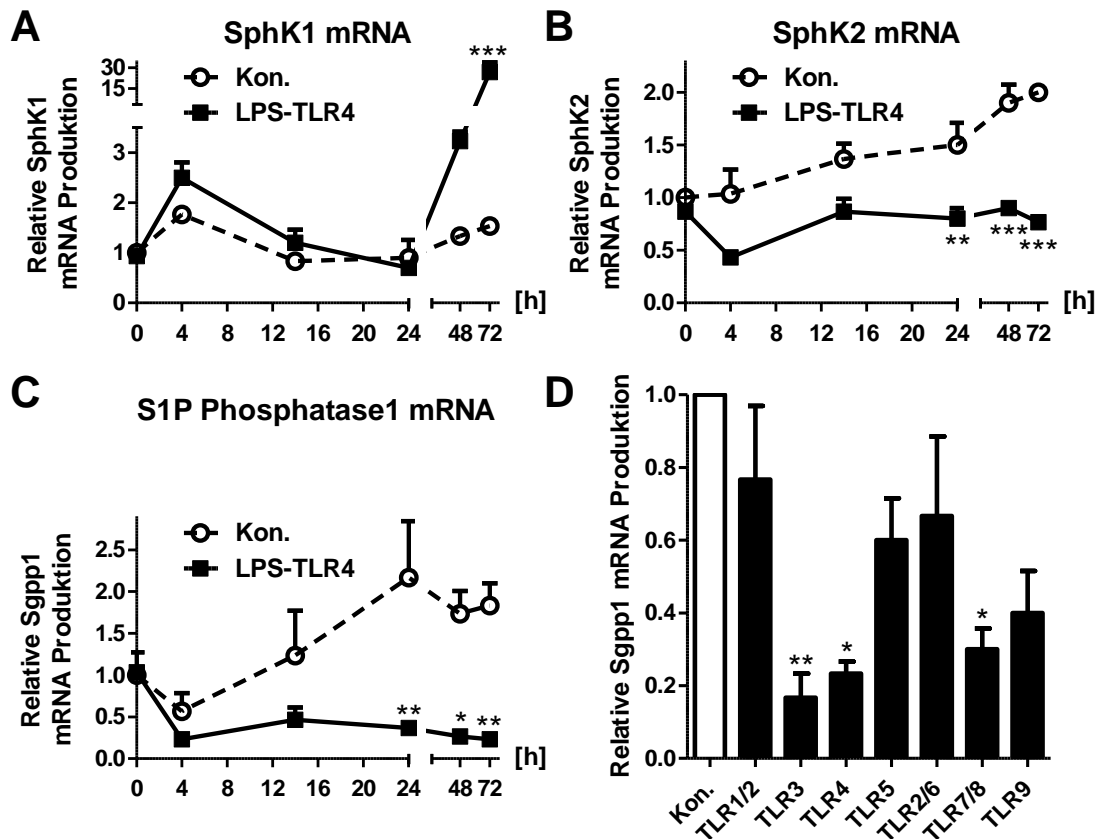


Abbildung 25: Kinetiken der SphK1, SphK2 und S1P Phosphatase1 nach Aktivierung der DCs.

Zellen wurden mit 1 µg/ml LPS für 0, 4, 14, 24, 48 und 72 h behandelt und die Expression von (A) SphK1, (B) SphK2 und (C) SPP1 wurde mittels quantitativer Realtime-PCR analysiert. In (D) wurde mit unterschiedlichen TLR-Liganden (siehe **Abbildung 17 C**) für 18 h stimuliert und die SPP1-Expression durch Realtime-PCR quantifiziert. Signifikanzen zwischen der unbehandelten Kontrolle (Kon.) und der jeweiligen stimulierten Probe wurden in (A) bis (C) durch 2way ANOVA und in (D) durch 1way ANOVA ermittelt. SphK1/2 = Sphingosinkinase 1/2. Sgpp1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Phosphatase1. n=3.

Zusätzlich wurde die SPP1 mRNA nach Stimulation unterschiedlicher TLRs gemessen (**Abbildung 25 D**). Es ist sehr auffällig, dass die Aktivierung aller membranständigen TLRs (3, 4, 7/8 und 9) eine fast überall signifikante Herunterregulation von SPP1 bewirkt. SPP2 dagegen konnte nach wiederholten Versuchen und Messungen zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

Angeichts dieser unterschiedlichen Regulationen der Enzym-mRNA war es schließlich interessant die zellulären Konzentrationen der beiden Sphingolipide, S1P und Sphingosin, zu bestimmen. Beide wurden nach einer Lipidextraktion des

Gesamtzellpellets durch LC-MS/MS gemessen und auf die vorher ausgezählte Gesamtzellzahl normalisiert.

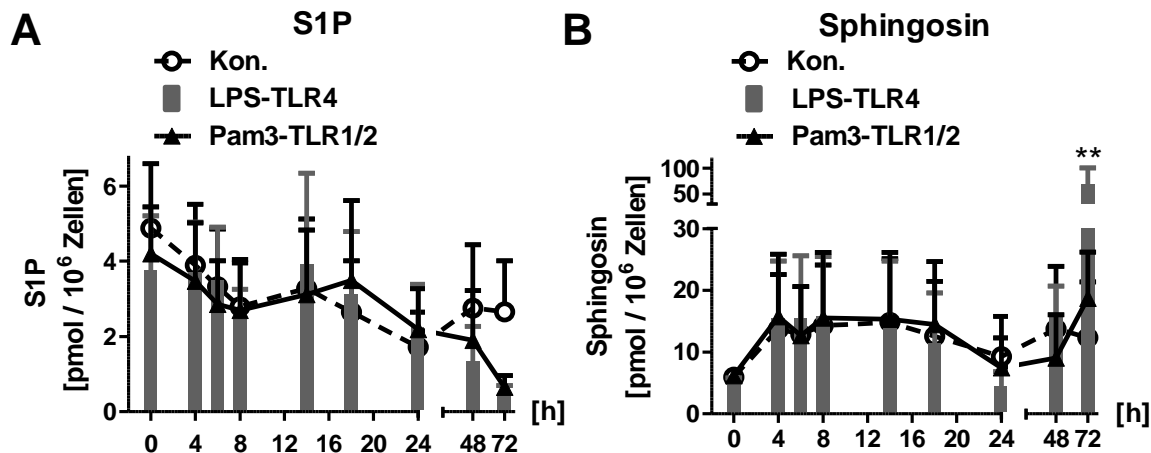


Abbildung 26: Gemessene Konzentrationen des intrazellulären S1P und Sphingosin nach DC-Aktivierung.

KM-DCs wurden mit 1 µg/ml LPS oder 1 µg/ml Pam3 CSK4 für 0, 4, 6, 8, 14, 18, 24, 48 und 72 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Konzentrationen von S1P in (A) und von Sphingosin in (B) wurden durch LC-MS/MS quantifiziert. Die absoluten Konzentrationen wurden auf die Gesamtzellzahl normalisiert. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle (Kon.) und der jeweiligen LPS-stimulierten Probe wurde per 2way ANOVA bestimmt. n=5-6.

Die S1P-Konzentrationen aus stimulierten und unbehandelten DCs verliefen in ihrem Profil bis zur 14 h Inkubation sehr ähnlich (**Abbildung 26 A**). Jedoch schlägt dies nach 24 h Stimulation drastisch um. Schließlich wurde in den LPS-stimulierten DCs $0,48 \pm 0,21$ pmol S1P, in den unstimulierten Zellen hingegen das 5,5-fache an S1P ($2,66 \pm 1,35$ pmol S1P / 1×10^6 Zellen) gemessen. Im Gegensatz dazu enthielten die Zellen nach 72-stündiger LPS-Stimulation signifikant höhere Sphingosin-Mengen ($68,5 \pm 31,53$ pmol) als unbehandelte DCs ($12,34 \pm 9,05$ pmol) (**Abbildung 26 B**). Nach der Pam3-Behandlung ist zu diesem Zeitpunkt ein Trend des zunehmenden Sphingosins sichtbar.

In diesem Abschnitt wurde also gezeigt, dass beide TLR-Stimuli, LPS und Pam3, über die Zeit eine signifikante SPL mRNA-Herunterregulation bewirken, welche zudem auf Ebene der Enzymaktivität nach 48 h LPS-Stimulation bestätigt werden konnte.

Zusätzlich zeigten die SphK1- und SphK2 mRNA-Profile eine zueinander gegensätzliche Stimulus-induzierte Regulation auf. Hingegen ähnelt die SPP1 mRNA-Expression derjenigen der SPL mRNA. Demgegenüber stehen nach der Langzeitstimulation eine extrem geringe intrazelluläre S1P-Konzentration und eine stark erhöhte Sphingosin-Menge.

4.3.4 Funktionelle Bedeutung der TLR-induzierten SPL-Reduktion und Sphingosin-Zunahme

Es sollte weiterhin analysiert werden, ob der physiologische Rückgang von SPL und Induktion von später SphK1 mRNA sowie von Sphingosin nach einer TLR-Aktivierung von weiteren funktionellen Eigenschaften der DCs begleitet wird.

4.3.4.1 Zeitlich-determinierte IL-12p70 Sekretion

Es ist bekannt, dass über die SphK1/S1P/S1PR₁-Achse die IL-12p70 Produktion in DCs eindeutig verringert wird (Schröder et al., 2011; Schaper et al., 2014). Aufgrund der erhöhten SphK1-Werte in spät aktivierten DCs bestand die Vermutung, dass das durch SphK1 produzierte und in den Extrazellularraum transportierte S1P die IL-12p70 Produktion über S1PR₁ hemmen würde. Parallel zur oben geschilderten Messung der Enzym-mRNA nach Kurz- und Langzeitinkubation der DCs mit und ohne Stimuli wurde aus den Zellüberständen IL-12p70 mittels ELISA quantifiziert. Anschließend wurden die Werte auf die jeweils ermittelte Gesamtzellzahl, welche nach der Stimulation erhoben wurde, berechnet.

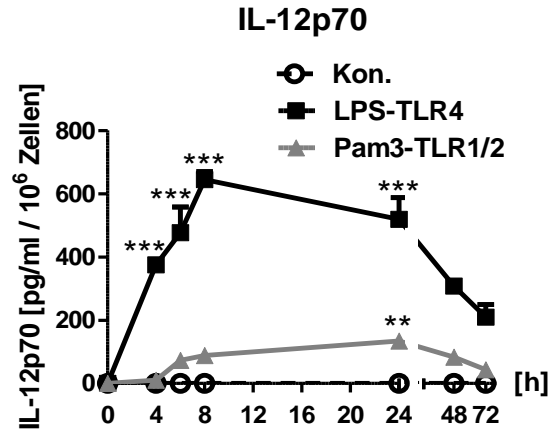


Abbildung 27: IL-12p70 Sekretion nach zeitabhängiger Stimulation der KM-DCs.

Zellen wurden mit 1 µg/ml LPS oder 1 µg/ml Pam3 CSK4 für 0, 4, 6, 8, 24, 48 und 72 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Das IL12p70 aus den Überständen wurde mittels ELISA gemessen und Werte wurden auf die Gesamtzellzahl normalisiert. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle (Kon.) und der jeweiligen LPS- oder Pam3-stimulierten Probe wurde per 2way ANOVA bestimmt. n=3.

Die ermittelte IL-12p70 Kurve ergab nach 8 h LPS-Stimulation die höchsten IL-12p70 Mengen, wenn auf die Gesamtzellzahl normalisiert wurde (**Abbildung 27**). Nach diesem Zeitpunkt verringerte sich IL-12p70, zunächst moderat dann aber stärker. Die DC-Aktivierung durch Pam3 ergab eine im Vergleich zu LPS stark abgeschwächte IL-12p70 Sekretion, deren Höhepunkt bei 24 h Inkubation lag.

4.3.4.2 Reduktion des Zellüberlebens nach verlängerter TLR-Aktivierung

Extrazelluläres S1P, welches durch SphK1 phosphoryliert wurde, begünstigt bekanntlich das Zellüberleben über S1PR₁ (Limaye et al., 2005). Im Abschnitt 4.1.2 wurde gezeigt, dass der Anteil spät apoptotischer/toter SphK1-defizienter DCs höher war als der von WT-DCs nach der Stimulation. Bei Aktivierung der DCs für 20 h ist SphK1 also für ein verstärktes Zellüberleben verantwortlich. Folglich wurde das Zellüberleben auch nach einer Langzeitstimulation der DCs überprüft. Zum einen untersuchten wir die Lebendzellzahl, welche unmittelbar nach jeder Stimulationsphase durch das Anfärben mit Trypanblau bestimmt wurde. Zum anderen wurden spät apoptotische Zellen durch die FACS-Messung analysiert.

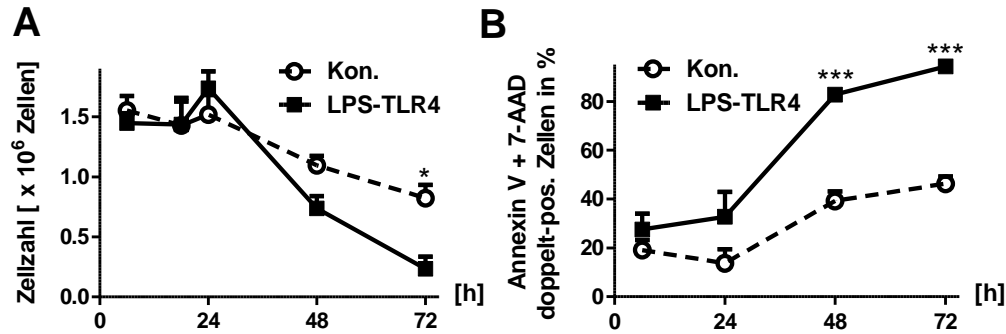


Abbildung 28: Reduziertes Zellüberleben nach TLR4-Aktivierung der DCs.

Zellen wurden mit 1 µg/ml LPS für mehrere Zeitpunkte stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). In (A) wurden die Zellen nach jeder Inkubationsphase mit Trypanblau gefärbt und ausgezählt. n=7. In (B) wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD inkubiert und doppel-positive Zellen wurden im FACS detektiert. n=4. Statistische Signifikanz zwischen der unbehandelten Kontrolle (Kon.) und der jeweiligen LPS-stimulierten Probe wurde per 2way ANOVA bestimmt.

Abbildung 28 deutet darauf hin, dass in spät aktivierten DCs eine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöhte Apoptose eingetreten ist. Die Lebendzellzahlbestimmung nach 72 h zeigt signifikant mehr lebende unbehandelte Kontrollzellen als LPS-stimulierte DCs (**Abbildung 28 A**). Bei der FACS-Analyse wurde nach Annexin V und 7-AAD-doppelt positiven Zellen sortiert (**Abbildung 28 B**). Annexin V färbt das durch apoptotische Zellen freigelegte Phosphatidylserin an und 7-AAD interkaliert in die DNA von Zellen, deren Membran zerstört ist. Als Resultat wurden weniger spät apoptotische unstimulierte Zellen detektiert als LPS-aktivierte Zellen. Schon nach 48 h LPS-Stimulation war der prozentuale Anteil der spät apoptotischen DCs doppelt so hoch ($82,8 \pm 2,39 \%$) im Vergleich zur Kontrolle ($39,17 \pm 3,95 \%$).

Da die Apoptose in den meisten Fällen über eine Aktivierung der Caspase 3 verläuft, wurde im Folgenden sowohl die nicht aktivierte (35 kDa) als auch die aktivierte (17 kDa) Form der Caspase 3 mit Hilfe des Western Blots untersucht.

Caspase 3 von 35 kDa wurde in unbehandelten Zellen geringfügig weniger produziert als in LPS-stimulierten Zellen (**Abbildung 29 A und C**). Während der Apoptose wird Caspase 3 gespalten und somit aktiviert, was durch die Positivkontrolle mit Staurosporin deutlich gezeigt wurde (**Abbildung 29 C**). Staurosporin ist ein unspezifischer Kinase-

Inhibitor, welcher die Zellapoptose induziert. Nach 48 h LPS-Inkubation war der prozentuelle Anteil der aktivierten Caspase 3 von 17 kDa tendenziell höher als der von unbehandelten Zellen (**Abbildung 29 B und D**). Die im Vergleich zu den unstimulierten Zellen stärkere Bande bei 48 h LPS-Behandlung bekräftigt zusätzlich diese Aussage (**Abbildung 29 D**).

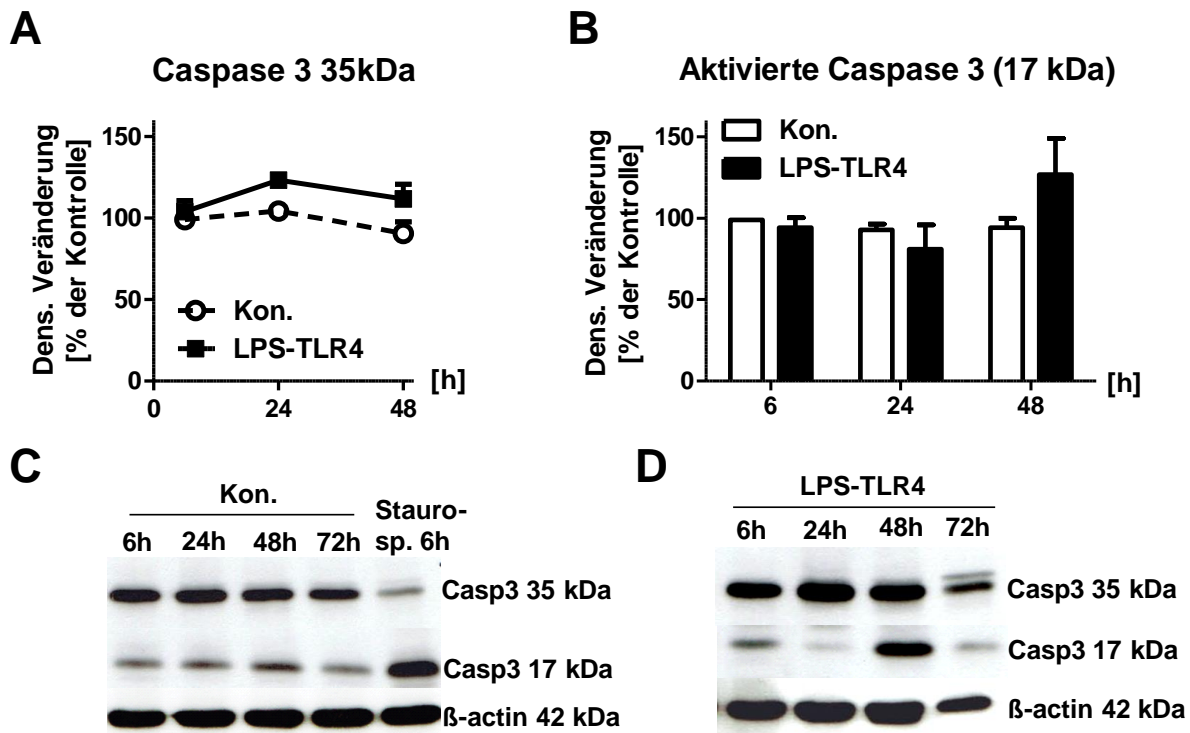


Abbildung 29: Die späte LPS-induzierte Apoptose in DCs ist Caspase 3-abhängig.

Zellen wurden mit 1 μ g/ml LPS für die in der Abbildung gezeigten Zeitpunkte stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Gesamtprotein wurde isoliert und 30 μ g des Proteins wurden zur Detektion von Caspase 3 und β -Aktin durch Western Blot verwendet. In (**A**) wird die nicht aktive Form der Caspase 3 (35 kDa) aus $n=2$ und in (**B**) die aktive Form bestehend aus 17 kDa gezeigt $n=4$. Die densitometrischen Veränderungen wurden auf die β -Aktin-Kontrolle und unstimulierte Kontrolle nach 6 h Inkubationszeit bezogen. In (**C**) und (**D**) wird jeweils ein repräsentatives Western Blot-Bild gezeigt. Zur Positivkontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit 2 μ M Staurosporin (Staurosp.) für 6 h inkubiert.

Zusammenfassend wurde nach der Langzeitaktivierung der DCs eine stark erhöhte Zellapoptose beobachtet, welche tendenziell Caspase 3-abhängig ist und nach 48 h Stimulation eintritt. Dieser aktivierungs-induzierte Zelltod ist im Wesentlichen von der SPL-Herunterregulation sowie SphK1- und Sphingosin-Erhöhung begleitet.

4.3.5 Ausschalten der S1P Lyase durch Tamoxifen *in vitro* und *in vivo*

Da diese Arbeit hauptsächlich auf die Rolle der S1P Lyase während Entzündungsreaktionen fokussiert war, sollte des Weiteren ein Tamoxifen-induzierbares Cre-Rekombinase-System zur Ausschaltung von SPL ausgetestet werden. Dazu wurden zwei Maus-Zuchtlinien von Novartis bereitgestellt und das System sollte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Gabe von Tamoxifen überprüft werden. Anhand des Schemas in **Abbildung 30** soll die Funktionsweise dieses Systems veranschaulicht werden.

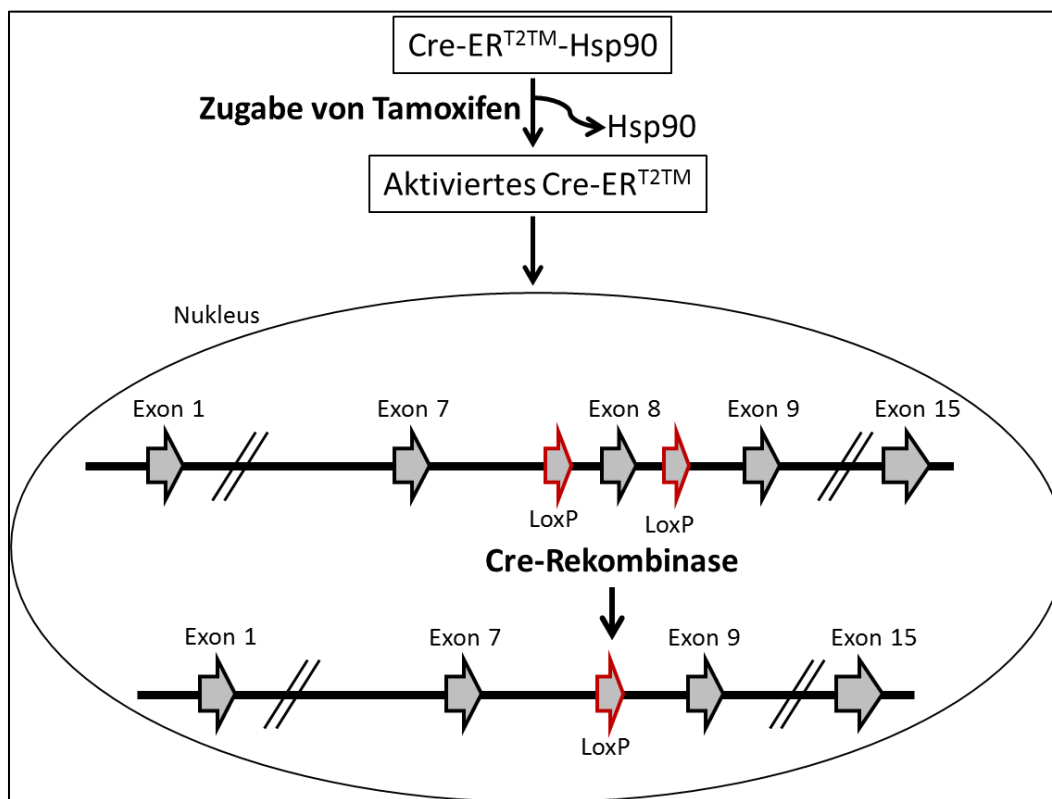


Abbildung 30: Durch Tamoxifen induzierbare SPL-Defizienz mit Hilfe der Cre-Rekombinase.

Das Cre-ER^{T2TM} ist eine Cre-Rekombinase, welche in der Zelle an ein Östrogenrezeptor (ER) gebunden ist. Dessen Ligandenbindedomäne (T2TM) ist jedoch mutiert, so dass Tamoxifen anstelle von 17 β -Estradiol daran binden kann. Wird Tamoxifen verabreicht, dissoziiert ein Hitzeschockprotein (Hsp90) und das aktivierte Cre-Protein kann im Nukleus die sich zwischen den LoxP-sites befindliche Region, in diesem Fall Exon 8, ausschneiden. Als Resultat sollte dann eine LoxP-site verbleiben.

Zur Generierung der Tamoxifen-induzierbaren SPL-defizienten Mäuse wurden die geflochtenen SPL-Mäuse mit der B6.C actb-Cre-ER^{T2TM}-knock-in-Mauslinie gekreuzt. Diese

induzierbare Cre-Mauslinie entstand durch das Ersetzen der geflochtenen EGFP-Kassette mit dem Cre-ER^{T2TM} im β -Aktin-Lokus (Jägle et al., 2007) und das Zurückkreuzen zum C57BL/6-Hintergrund. Schließlich wurden zwei Stämme generiert und freundlicherweise von Novartis zur Verfügung gestellt: die homozygoten $SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-}$ und die heterozygoten $SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}$ -Mauslinien. Die Ersteren dienen zur Kontrolle des Tamoxifens (hiernach bezeichnet als Tamoxifen-Kon.) und die Letzteren sollten die durch Tamoxifen induzierbaren SPL-defizienten Zellen/Mäuse (Tamoxifen-induz. $Sgpl1^{-/-}$) darstellen.

4.3.5.1 Charakterisierung der Tamoxifen-induzierbaren SPL-Defizienz *in vitro*

Im Folgenden wurden KM-DCs aus WT-, $SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-}$ und $SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}$ -Mäusen nach der GM-CSF-Differenzierungsphase mit und ohne Tamoxifen behandelt, um die nötige Inkubationsdauer für eine SPL-Defizienz zu erfassen. Nach unterschiedlicher Inkubationszeit sollte die revers transkribierte mRNA aus Zellen auf die Expression von SPL durch eine Realtime-PCR untersucht werden.

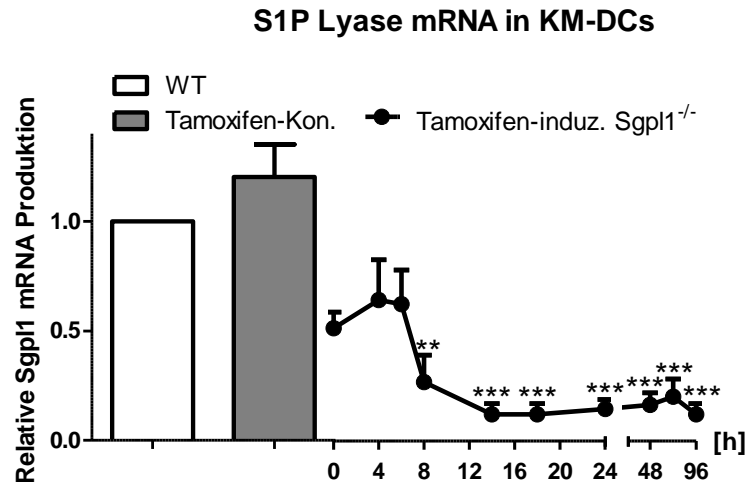


Abbildung 31: SPL mRNA-Expression aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-}- und SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}-KM-DCs wurden mit 1 μ M Tamoxifen für unterschiedliche Zeitperioden behandelt oder WT-KM-DCs wurden unbehandelt gelassen. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Realtime-PCR auf die Expression von SPL hin untersucht. Als Referenzgen wurde CsnK2a2 gemessen. Die SPL-Werte wurden sowohl auf CsnK2a2 als auch auf die interne WT-Kontrolle normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. Zusätzlich wurden die Werte der SPL mRNA-Expression aus den WT- und Tamoxifen-Kontroll-Zellen (=SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-}) nach der jeweiligen Inkubationsdauer zu einem Mittelwert zusammengefasst. Statistische Signifikanz zwischen der WT Kontrolle und den jeweiligen Tamoxifen-behandelten Cre^{+/-}-KM-DCs (=Tamoxifen-induz. Sgpl1^{-/-}) wurde mittels 1way ANOVA ermittelt. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase. n=3-4.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die mRNA-Werte der Tamoxifen-induzierbaren Sgpl1^{-/-}-Zellen auf die der WT-Zellen nach der jeweiligen Inkubationsdauer bezogen (**Abbildung 31**). Die Tamoxifen-induzierbaren Cre^{+/-}-Zellen regulierten die S1P Lyase bereits nach 8 h Tamoxifenbehandlung signifikant zu 64% herunter. Nach 14 bis 96 h verblieben in den Zellen allerdings ca. 17% der SPL mRNA. Über die Lebensspanne der DCs *in vitro* wurde SPL also nicht komplett durch Tamoxifen ausgeschaltet.

Weiterhin war es interessant zu analysieren, ob die Herunterregulation von SPL durch Tamoxifen in den SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}-Zellen der Reduktion durch LPS in den WT-Zellen ähnelt. Die DCs wurden wie oben beschrieben behandelt und zusätzlich mit und ohne

LPS stimuliert. Daraufhin ergab die Realtime-PCR-Analyse von SPL die in der **Abbildung 32** dargestellten Ergebnisse.

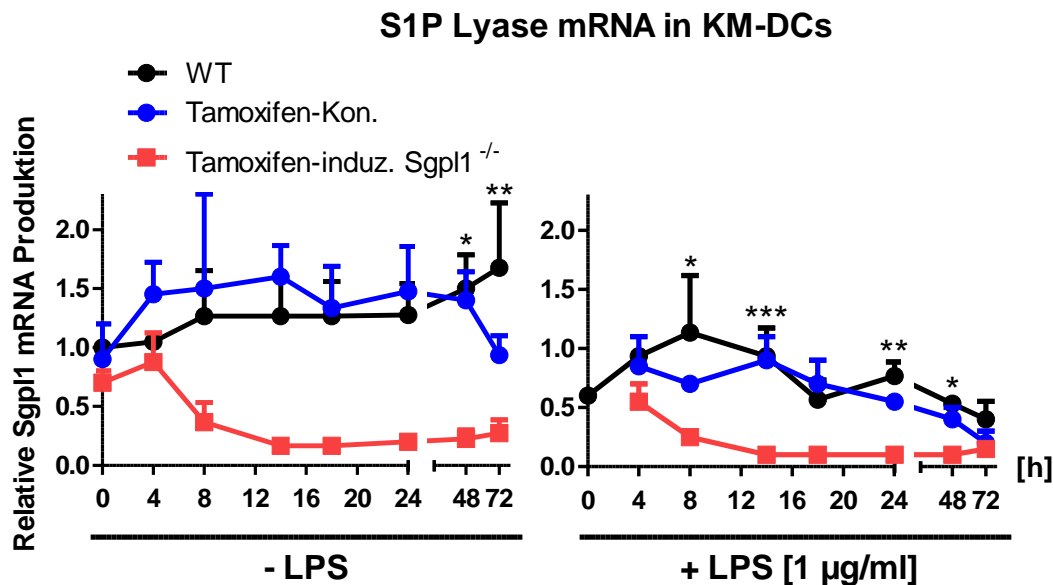


Abbildung 32: SPL mRNA-Expression aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus den drei unterschiedlichen Genotypen wurden mit 1 µM Tamoxifen für unterschiedliche Zeitperioden behandelt oder WT-KM-DCs wurden unbehandelt gelassen. n=3-4. Alternativ wurden die Zellen zusätzlich mit 1 µg/ml LPS stimuliert (rechts in der Abb.). n=2-3. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA mittels quantitativer Realtime-PCR auf die Expression von SPL hin untersucht. Als Referenzgen wurde CsnK2a2 gemessen. Die SPL-Werte wurden sowohl auf CsnK2a2 als auch auf die interne WT-Kontrolle normalisiert, um Schwankungen bei der cDNA-Synthese sowie zwischen den einzelnen Werten auszugleichen. Statistische Signifikanz zwischen WT- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs wurde mittels 1way ANOVA ermittelt. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase.

Vergleicht man zwischen den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-DCs (die rote Linie links) und den LPS-stimulierten WT-Zellen (die schwarze Linie rechts) wird deutlich, dass durch LPS die S1P Lyase langsamer herunterreguliert wurde als in den genmanipulierten Zellen durch Tamoxifen. In den LPS-behandelten Zellen (rechts in der Abbildung) war der Unterschied zwischen den WT- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs bis zu 48 h noch signifikant. Jedoch ist die SPL-Reduktion durch LPS nach 72 h Stimulation mit der durch Tamoxifen vergleichbar. Die Hemmung der S1P Lyase durch beides, Tamoxifen und LPS, in den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs zeigt zudem eine um 7% stärkere Herunterregulation verglichen mit den Proben ohne LPS.

Wir beobachteten ebenso eine indirekte funktionelle Eigenschaft der S1P Lyase in den WT-, Tamoxifen-Kontroll- und den Tamoxifen-induzierten *Sgpl1*^{-/-}-KM-DCs durch die Messung der intrazellulären S1P-Mengen mittels LC-MS/MS. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen differenziell mit Tamoxifen und LPS für unterschiedliche zeitliche Perioden inkubiert und daraufhin die Zellen gezählt sowie Lipide aus den Zellpellets extrahiert.

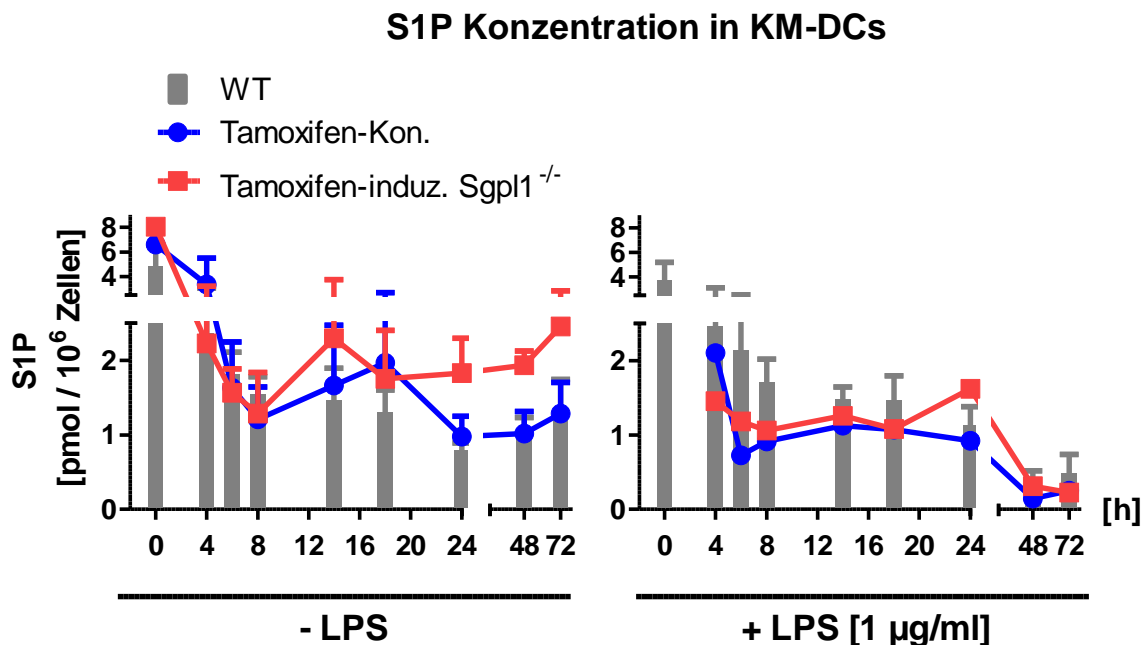


Abbildung 33: Gemessene S1P Konzentrationen aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten *Sgpl1*^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus den drei unterschiedlichen Genotypen wurden mit 1 µM Tamoxifen für unterschiedliche Zeitperioden behandelt n=2-3, oder WT-KM-DCs wurden unbehandelt gelassen n=4-5. Alternativ wurden die Zellen zusätzlich mit 1 µg/ml LPS stimuliert (rechts in der Abb., WT: n=4-5; Tamoxifen-Kon.- und Tamoxifen-induz. *Sgpl1*^{-/-}-KM-DCs: n=1). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Lipide extrahiert und mittels LC-MS/MS gemessen.

In den unstimulierten Zellen (**Abbildung 33** links) kann man innerhalb von 24 h nach Tamoxifenbehandlung geringfügig größere Konzentrationen an S1P in Tamoxifen-induzierten *Sgpl1*^{-/-}-KM-DCs als in den beiden anderen Kontroll-Genotypen beobachten. Durch LPS jedoch (**Abbildung 33** rechts) sanken nicht nur in den WT- und Tamoxifen-Kontroll-Zellen die S1P-Mengen weiter herab sondern auch in den Tamoxifen-induzierten *Sgpl1*^{-/-}-KM-DCs.

Da höhere Sphingosin-Mengen infolge einer LPS-Stimulation der DCs über ihre Lebensspanne hinweg festgestellt wurden (Ergebnisteil 4.3.3), sollten auch im Zusammenhang mit der Herunterregulation der S1P Lyase durch Tamoxifen die Konzentrationen von Sphingosin bestimmt werden.

Sphingosin Konzentration in KM-DCs

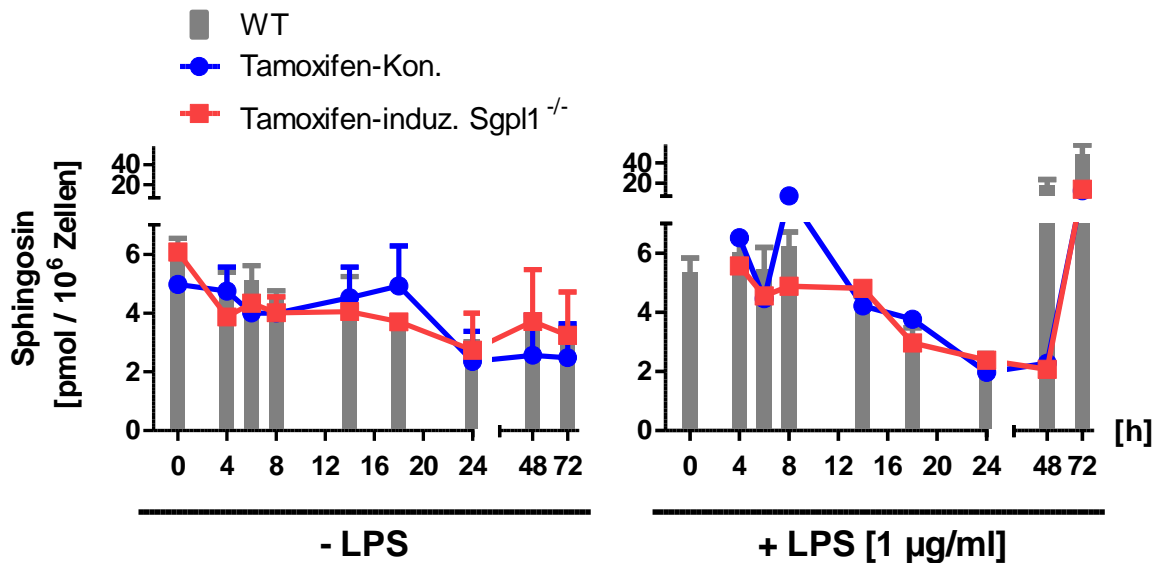


Abbildung 34: Gemessene Sphingosin Konzentrationen aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte WT-, Tamoxifen-Kon.- und Tamoxifen-induz. Sgpl1^{-/-}-KM-DCs wurden mit 1 µM Tamoxifen für unterschiedliche Zeitperioden behandelt n=2-3 oder WT-KM-DCs wurden unbehandelt gelassen n=4. Alternativ wurden die Zellen zusätzlich mit 1 µg/ml LPS stimuliert (rechts in der Abb.) (WT: n=4; Tamoxifen-Kon.- und Tamoxifen-induz. Sgpl1^{-/-}-KM-DCs: n=1). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Lipide extrahiert und mittels LC-MS/MS gemessen.

Die Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs produzierten vergleichbare Mengen an Sphingosin wie die WT- und Tamoxifen-Kontroll-Zellen (**Abbildung 34 links**). Nach der LPS-Stimulation fand in den WT-DCs schon nach 48 h, in den zwei anderen Genotypen allerdings 24 h später, eine drastische Zunahme an Sphingosin statt (**Abbildung 34 rechts**).

Um einen Anhaltspunkt für die inflammatorische Eigenschaft der Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs zu liefern, wurde des Weiteren IL-12p70 aus den Überständen der LPS-stimulierten Zellen mittels ELISA gemessen.

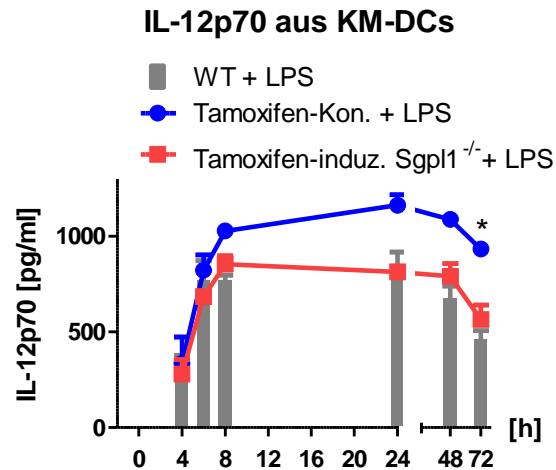


Abbildung 35: IL-12p70 Sekretion aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-Mäusen wurden mit 1 µM Tamoxifen und 1 µg/ml LPS für unterschiedliche Zeitperioden behandelt n=2 oder WT-KM-DCs wurden nur mit 1 µg/ml LPS stimuliert n=5-6. Zur Messung der IL-12p70 Konzentration aus den Überständen wurde ein ELISA durchgeführt. Statistische Signifikanz zwischen WT- und Tamoxifen-Kon.-KM-DCs wurde per 1way ANOVA ermittelt.

Die freigesetzten IL-12p70 Konzentrationen aus den LPS-stimulierten WT-Zellen entsprachen genau denen der Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs (**Abbildung 35**). Die Tamoxifen-Kontroll-Zellen produzierten nach 72 h geringfügig höhere IL-12p70 Mengen. Zusätzlich wurden Überstände unstimulierter Zellen im ELISA gemessen. Diese lieferten jedoch keine nachweisbaren Mengen an IL-12p70.

Zusammenfassend ergab die *in vitro* Tamoxifen-Zugabe eine schnelle SPL-Herunterregulation, welche jedoch bei ca. 17% der verbliebenen SPL mRNA stagnierte. Nach 72 h der LPS-Stimulation in WT-Zellen bzw. Tamoxifen- und LPS-Zugabe in den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs konnte eine vergleichbare SPL-Herunterregulation beobachtet werden. Tamoxifen *in vitro* bewirkt also keine vollständige SPL-Defizienz über die Lebensspanne der KM-DCs. Darüber hinaus wird

intrazelluläres S1P ausschließlich durch eine Langzeitstimulation mit LPS reduziert wohingegen Sphingosin dadurch stark erhöht wird. Dieses Phänomen wurde sowohl in den zwei Kontroll-Genotypen als auch in Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs beobachtet. Für die IL-12p70 Sekretionsmengen ergab sich schließlich, dass die SPL-Reduktion durch LPS (WT-Zellen) und durch Tamoxifen (Tamoxifen-induz. Sgpl1^{-/-}-KM-DCs) + LPS vergleichbare Konzentrationen dieses Zytokins lieferte.

4.3.5.2 Überprüfung der Tamoxifen-induzierbaren SPL-Defizienz *in vivo*

WT-, SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-}- und SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}-Mäusen wurde nach dem Schema in **Abbildung 36** Tamoxifen oder das Lösungsmittel für Tamoxifen nach den von Novartis angegebenen Vorgaben peroral verabreicht. Darauf erfolgte die Isolation von Milzzellen und KM-Zellen, welche stimuliert wurden und auf die Expression verbliebener S1P Lyase sowie der IL-12p70 Untereinheiten und auf Konzentrationen der intrazellulären Sphingolipide untersucht wurden.

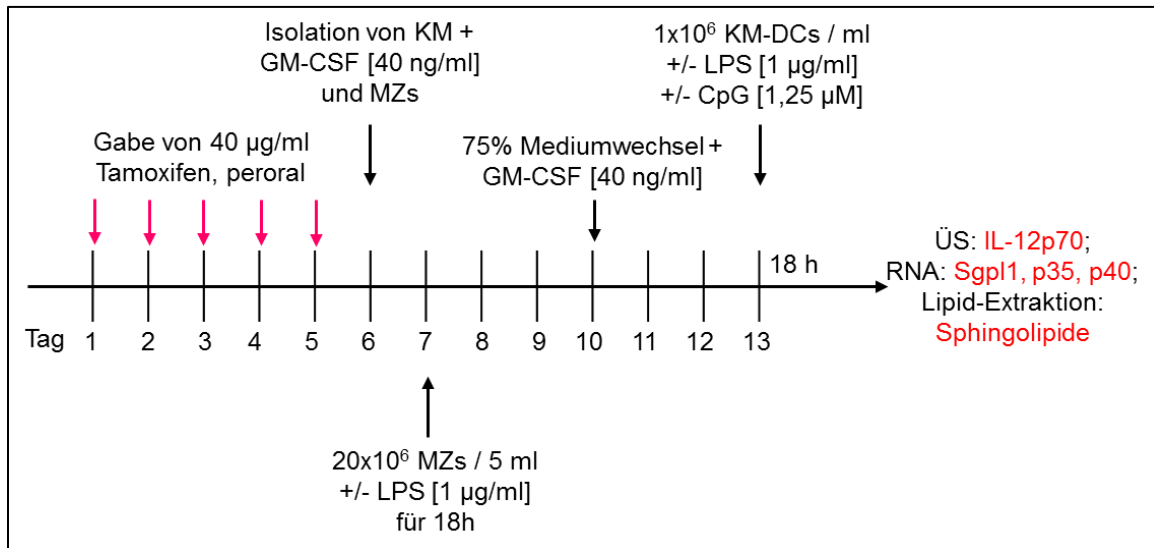


Abbildung 36: Vorgehen der Induktion der SPL-Defizienz durch Tamoxifen *in vivo* und Isolation von Knochenmarks- und Milzzellen zur weiteren Analyse.

Tamoxifen (8 mg/ml) wurde in einem Sonnenblumenöl-Ethanol-Gemisch (10:1) zu 40 mg pro kg Körpergewicht dosiert und sowohl heterozygoten als auch homozygoten ($SPL^{Flx/Flx} Cre^{-/-}$ und $SPL^{Flx/Flx} Cre^{+/+}$) C57BL/6-Mäusen verabreicht. Als Kontrolle dienten WT-Mäuse, welchen ebenfalls peroral das Sonnenblumenöl-Ethanol-Gemisch jedoch ohne Tamoxifen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht wurde. Am sechsten Tag wurden Knochenmark (KM) und Milzzellen (MZs) wie gewohnt isoliert und in Kultur gesetzt. Darauf folgte die Stimulation der Milzzellen mit LPS oder der ausdifferenzierten KM-DCs mit den angegebenen Konzentrationen von LPS oder CpG für 18 h. Die Überstände (ÜS) wurden für IL-12p70-ELISA verwendet, aus der RNA wurde die Expression von SPL, IL-12p35 und IL-12p40 untersucht und parallel wurden KM-DCs für die Lipid-Extraktion stimuliert und Lipide durch LC-MS/MS detektiert.

4.3.5.2.1 Milzzellen

Zunächst wurden am Tag 7 nach Versuchsbeginn die isolierten Milzzellen aus den drei Maus-Genotypen mit und ohne LPS für 18 h inkubiert. Die Expression der S1P Lyase sollte mittels Realtime-PCR untersucht werden. Dabei dienten zur SPL-Analyse zwei unterschiedlich spezifische Primer-Sonden: Zum einen wurden Sonden eingesetzt, welche die Region zwischen dem Exon 3 und 4 detektieren (**Abbildung 37** links) und zum anderen spezifisch designte Sonden, welche Exon 8 detektieren sollten (**Abbildung 37** rechts), so dass das durch die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase deletierte Exon 8 der S1P Lyase direkt im Zusammenhang mit dem nicht detektierten Exon 8 durch die spezifische Sonde steht.

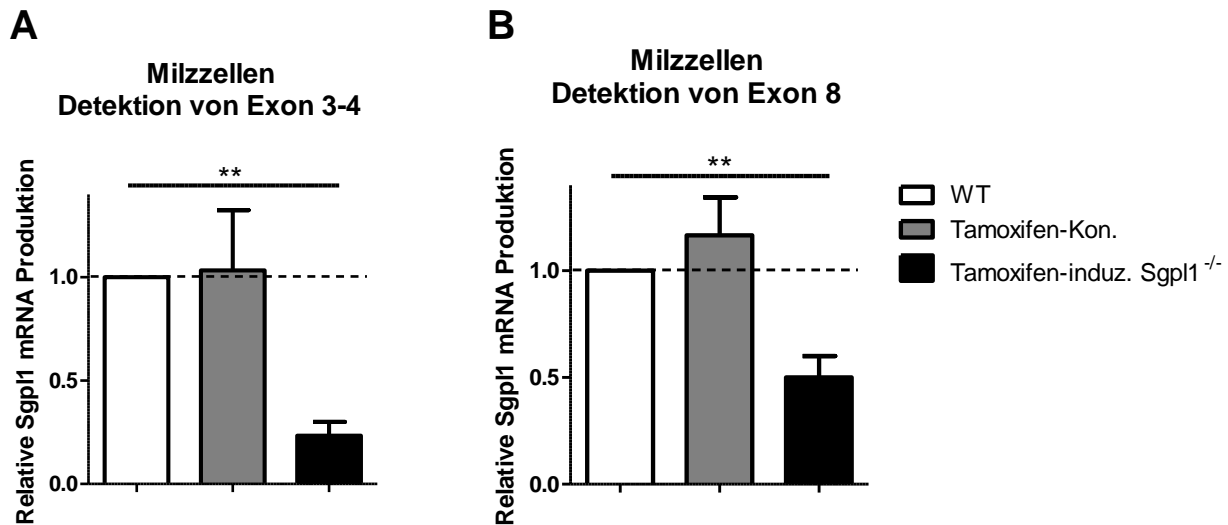


Abbildung 37: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten Milzzellen detektiert durch unterschiedlich spezifische Realtime-PCR-Sonden.

Milzzellen wurden aus den drei Gruppen isoliert (WT-Mäuse behandelt mit Sonnenblumenöl-Ethanol-Gemisch, Tamoxifen-Kon. = homozygote Mäuse für Cre, welche als die Tamoxifen-Kontrolle dienen, da diese keine SPL-Defizienz infolge des Fehlens von Cre aufweisen sollen und Tamoxifen-induzierte SPL-defiziente Mäuse). Nach erfolgter Inkubation der Zellen für 18 h wurde die RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA auf die SPL-Expression mittels Realtime-PCR überprüft. In (A) wurden Sonden für den Bereich der SPL-cDNA zwischen Exon 3 und 4 herangezogen, welche auch in den vorherigen Experimenten genutzt wurden. In (B) wurden Sonden speziell für den Bereich von SPL kreiert, welcher nach der Rekombination durch Cre herausgeschnitten werden sollte (Exon 8). Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase. n=3.

Die Amplifikation des Bereichs zwischen Exon 3 und 4 lieferte in den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-Milzzellen einen S1P Lyase mRNA-Rest von 23%. Die spezifische Sonde für Exon 8 detektierte jedoch fast das Doppelte an SPL mRNA in diesen Zellen. Auch in den Tamoxifen-Kontroll-Milzzellen wurde anhand der spezifischen Sonde für Exon 8 geringfügig mehr an SPL mRNA quantifiziert als in den WT-Zellen.

Da die Milzzellen auch mit LPS stimuliert wurden, werden im Folgenden die oben gezeigten Ergebnisse der SPL-Expression in unstimulierten Zellen mit denen der LPS-inkubierten Zellen verglichen.

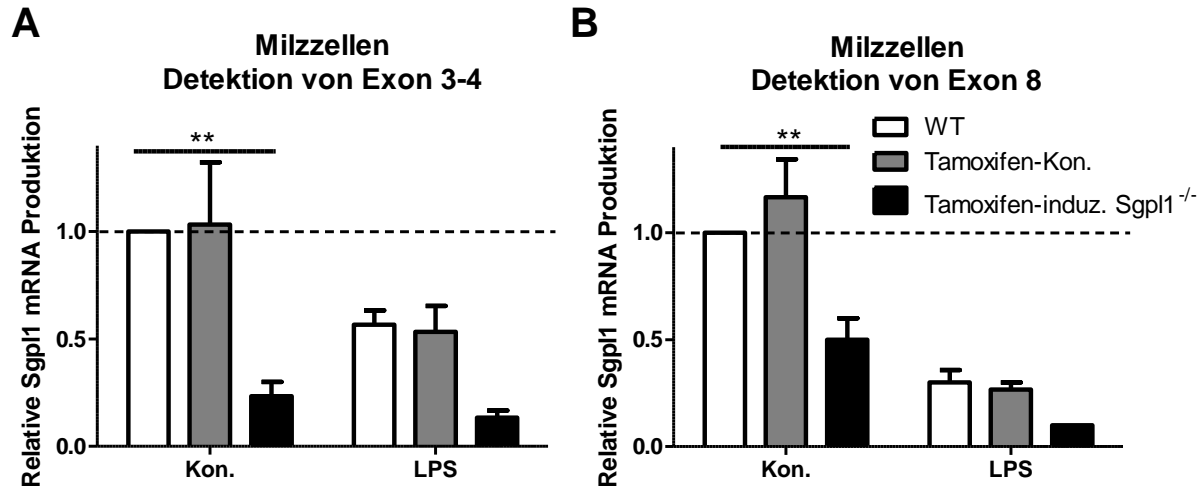


Abbildung 38: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten Milzzellen.

Isolierte Milzzellen aus den drei Gruppen (siehe **Abbildung 37**) wurden mit 1 µg/ml LPS für 18 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Die SPL-Expression wurde mit Hilfe von unterschiedlich spezifischen Sonden mittels Realtime-PCR überprüft. In (**A**) wurden Sonden für den Bereich der SPL-cDNA zwischen Exon 3 und 4 herangezogen und in (**B**) wurde Exon 8 von SPL auf dessen Anwesenheit überprüft. Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase. n=3.

Wie erwartet, reduzierte LPS die SPL-Expression in den Milzzellen aller drei Genotypen (**Abbildung 38**). In den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-Milzzellen ist diese sogar zusätzlich auf 13% (**Abbildung 38 A**) oder 10% (**Abbildung 38 B**) an SPL mRNA gesunken. Die Detektion von Exon 8 zeigt geringere Mengen der SPL mRNA in den zwei Kontroll-Gruppen wenn auf die unstimulierte Kontrolle normalisiert wurde.

Darüber hinaus war es wichtig zu untersuchen, ob die SPL-Herunterregulation durch beides, Tamoxifen und LPS, Auswirkungen auf die IL-12p70 Expression und Sekretion hat. Die mRNA wurde also auf IL-12p35 und IL-12p40 durch die Realtime-PCR analysiert und Konzentrationsmessungen des Heterodimers IL-12p70 aus dem Überstand wurden durch ELISA detektiert.

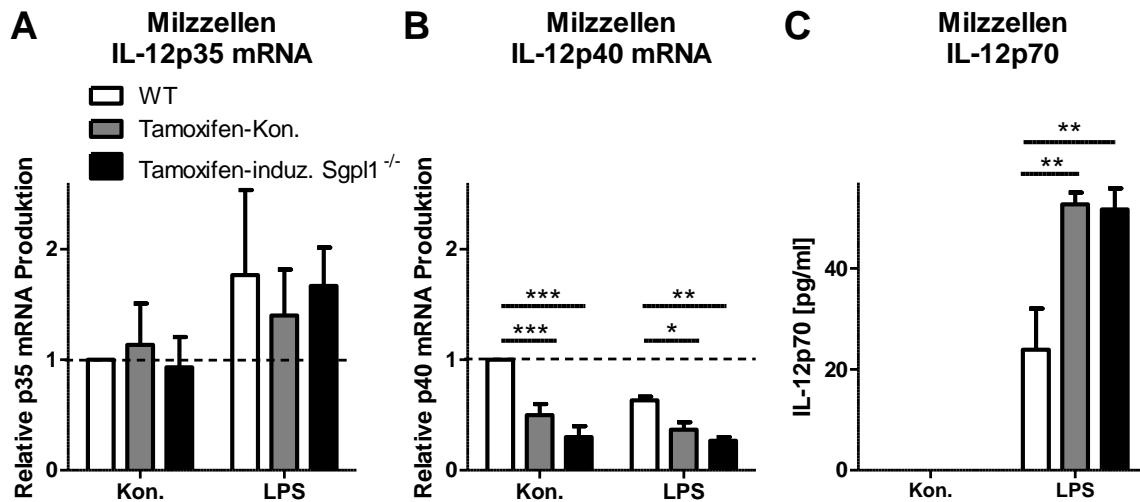


Abbildung 39: Expression und Sekretion von IL-12p70 aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten Milzzellen.

Isolierte Milzzellen aus den drei Gruppen (siehe **Abbildung 37**) wurden mit 1 µg/ml LPS für 18 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Aus der isolierten RNA wurde die umgeschriebene cDNA auf die Expression von **(A)** IL-12p35 oder **(B)** IL-12p40 mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht. In **(C)** wurden die IL-12p70 Konzentrationen aus dem Überstand mit Hilfe eines ELISAs durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. n=3.

Verglichen mit dem WT hatte die SPL-Reduktion durch Tamoxifen keinen induzierbaren Effekt auf die beiden Untereinheiten von IL-12p70 auf mRNA-Ebene (**Abbildung 39 A** und **B**). Stattdessen ist eine verminderte relative IL-12p40 mRNA-Produktion in den Tamoxifen-zugesetzten-DCs zu erkennen. Im Gegensatz dazu sekretierten die Zellen aus beiden Tamoxifen-behandelten Mausgruppen eine doppelt so hohe Menge an IL-12p70 in den Überstand verglichen zu den WT-Zellen. Dies weist darauf hin, dass die IL-12p70 Produktion in Milzzellen durch Tamoxifen unspezifisch verstärkt wird.

4.3.5.2.2 Differenzierte KM-DCs

Die Knochenmarkszellen wurden nach Isolation für sieben Tage durch GM-CSF differenziert und für 18 h unbehandelt inkubiert oder mit LPS bzw. CpG stimuliert (siehe Schema in **Abbildung 36**). Dann erfolgte zunächst die Analyse der SPL-Expression durch die Realtime-PCR mit Hilfe der unterschiedlichen Primer Sonden.

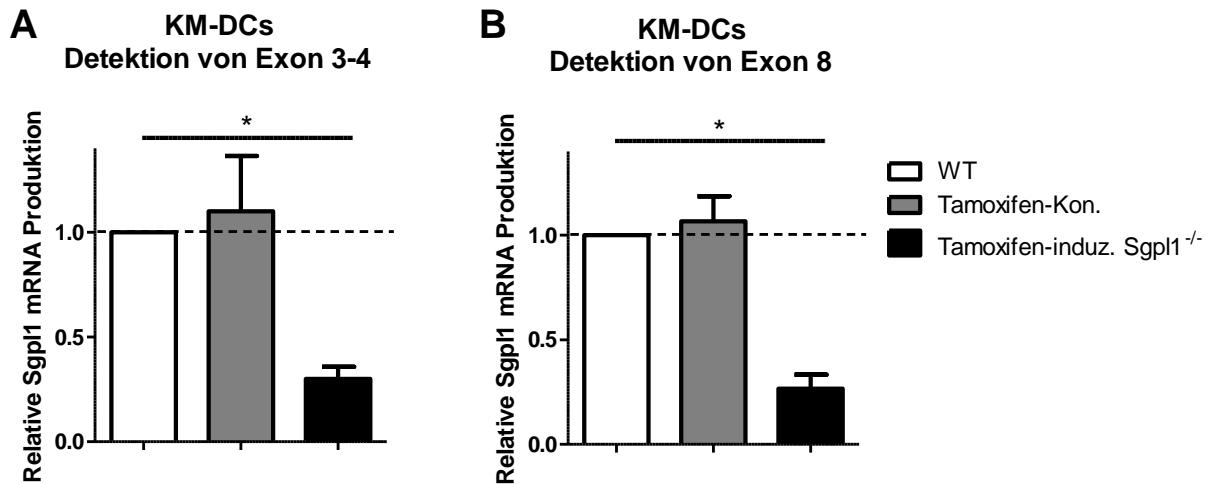


Abbildung 40: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten KM-DCs detektiert durch unterschiedlich spezifische Realtime-PCR-Sonden.

Differenzierte KM-DCs wurden aus den drei Gruppen isoliert (WT-Mäuse behandelt mit Sonnenblumenöl-Ethanol-Gemisch, Tamoxifen-Kon. = homozygote Mäuse für Cre, welche als die Tamoxifen-Kontrolle dienen, da diese keine SPL-Defizienz infolge des Fehlens von Cre aufweisen sollen und Tamoxifen-induzierte SPL-defiziente Mäuse). Nach erfolgter Inkubation der Zellen für 18 h wurde die RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA auf SPL-Expression mittels Realtime-PCR überprüft. In (A) wurden Sonden für den Bereich der SPL-cDNA zwischen Exon 3 und 4 herangezogen, welche auch in den vorherigen Experimenten genutzt wurden. In (B) wurden Sonden speziell für den Bereich von SPL kreiert, welcher nach der Rekombination durch Cre herausgeschnitten werden sollte (Exon 8). Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase. n=3.

Die Amplifikation der SPL mRNA im Bereich zwischen Exon 3 und 4 lieferte in den *ex vivo* differenzierten Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs eine Reduktion von 70% und im Bereich von Exon 8 eine Reduktion von 64% relativ zu den WT-DCs (**Abbildung 40**).

Diese SPL mRNA-Expression aus den unbehandelten Zellen wird im Folgenden zusätzlich mit der aus LPS- oder CpG-stimulierten DCs verglichen.

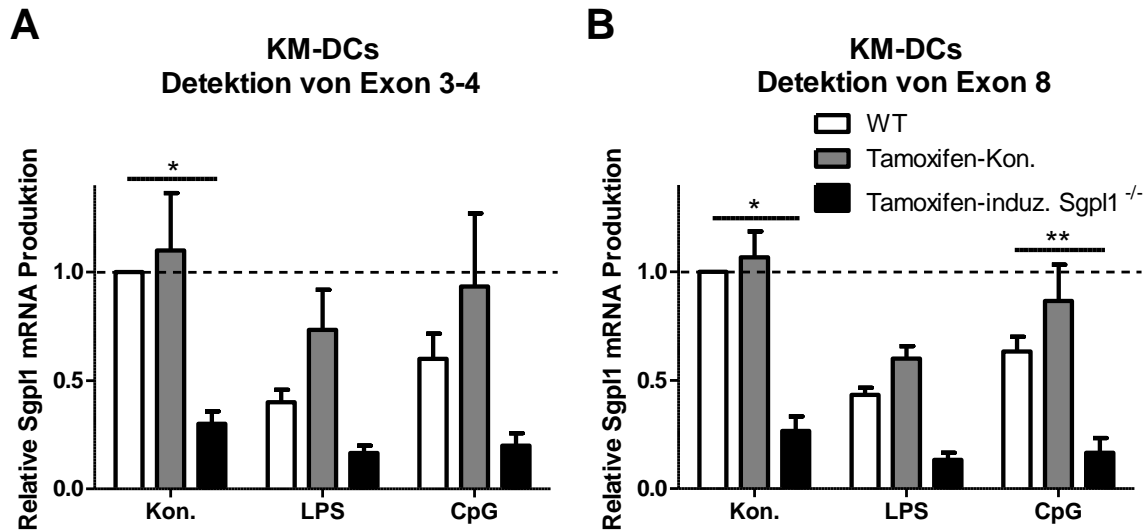


Abbildung 41: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus den drei Gruppen (siehe **Abbildung 40**) wurden mit 1 µg/ml LPS oder 1,25 µM CpG für 18 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Die SPL-Expression wurde mit Hilfe von unterschiedlich spezifischen Sonden mittels Realtime-PCR überprüft. In **(A)** wurden Sonden für den Bereich der SPL-cDNA zwischen Exon 3 und 4 herangezogen und in **(B)** wurde Exon 8 von SPL auf dessen Anwesenheit überprüft. Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. Sgpl1 = Gen-Bezeichnung für die S1P Lyase. n=3.

Wie in den Milzzellen, wurde die relative SPL mRNA-Produktion in den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs durch LPS, und auch durch CpG, verstärkt herunterreguliert (**Abbildung 41**). Die Detektion von Exon 3 bis 4 lieferte eine Hemmung der S1P Lyase zu 84% nach LPS- und zu 80% nach CpG-Behandlung. Bei der Quantifizierung des Exon 8 wurden unwesentlich geringere Mengen gemessen (nach LPS: 13% und nach CpG: 16%). Dagegen zeigt die Tamoxifen-Kontrolle durchgehend sogar etwas höhere SPL-Werte als der WT.

Um darüber Auskunft geben zu können, ob die Tamoxifen-induzierte SPL mRNA-Reduktion in den DCs Auswirkungen auf die Sphingolipid-Konzentrationen hat, sollten diese des Weiteren durch LC-MS/MS gemessen werden.

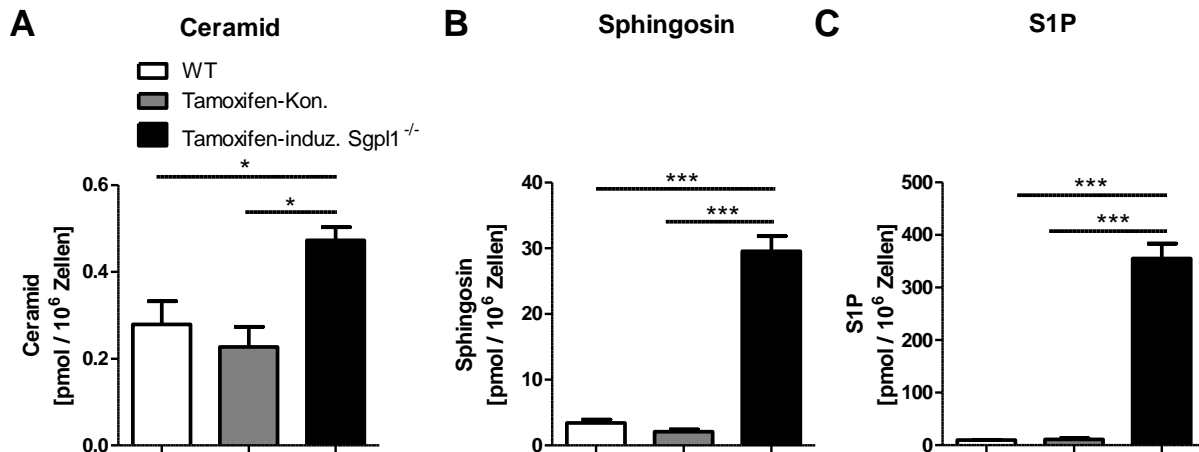


Abbildung 42: *salvage*-Sphingolipide aus Tamoxifen-induzierten SPL-defizienten KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus den drei Gruppen (siehe **Abbildung 40**) wurden für 18 h inkubiert. Lipide wurden aus den Zellen extrahiert und die Konzentrationen der Lipide, welche für den *salvage/recycling* Sphingolipid-Stoffwechsel bekannt sind, d.h. in (A) Ceramid, in (B) Sphingosin und in (C) S1P durch LC-MS/MS bestimmt. Die jeweiligen Mengen wurden auf die Gesamtzellzahl normalisiert. Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. n=3.

Die Messung zeigt, dass die Ceramid-Mengen aus Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs im Vergleich zu den beiden Kontroll-Gruppen deutlich erhöht waren (**Abbildung 42 A**). Für die zellulären Sphingosin- und S1P-Konzentrationen hatte die 70%ige Reduktion der SPL mRNA durch Tamoxifen erhebliche Folgen (**Abbildung 42 B und C**): Während die Sphingosin-Konzentration um das etwa 8-fache gegenüber dem WT anstieg waren die S1P-Mengen um das 37-fache größer als die des WT. Dieses Ergebnis implementiert, dass die Herunterregulation der S1P Lyase durch Tamoxifen-Gabe *in vivo* erheblichen Einfluss auf die Mengen der Sphingolipide hat und sich demnach von der Tamoxifen-induzierten SPL-Hemmung *in vitro* drastisch unterscheidet.

Es wurden auch weitere Sphingolipide durch LC-MS/MS quantifiziert, welche für die *de novo* Herstellung von S1P bekannt sind.

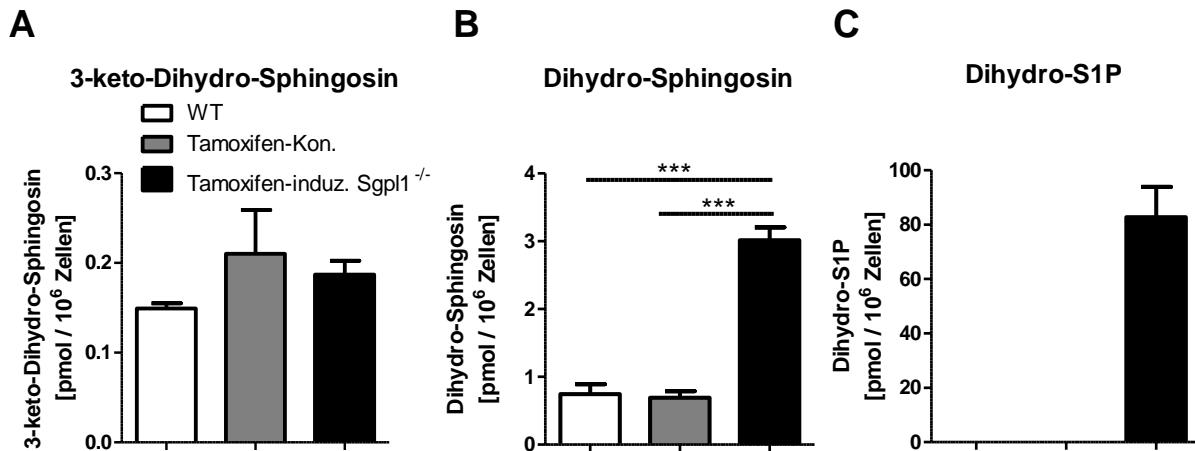


Abbildung 43: *de novo*-Sphingolipide aus Tamoxifen-induzierten SPL-defizienten KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus den drei Gruppen (siehe **Abbildung 40**) wurden für 18 h inkubiert. Lipide wurden aus den Zellen extrahiert und die Konzentrationen der Lipide, welche für den *de novo* Sphingolipid-Stoffwechsel bekannt sind, d.h. in **(A)** 3-keto-Dihydro-Sphingosin, in **(B)** Dihydro-Sphingosin und in **(C)** Dihydro-S1P durch LC-MS/MS bestimmt. Die jeweiligen Mengen wurden auf die Gesamtzellzahl normalisiert. Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. n=3.

Die gemessene Konzentration von 3-keto-Dihydro-Sphingosin war nur geringfügig verändert (**Abbildung 43 A**). Jedoch ist eine 3-fache Menge an Dihydro-Sphingosin in den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs gegenüber dem WT messbar gewesen (**Abbildung 43 B**). In WT- und Tamoxifen-Kontroll-Zellen hingegen konnte kein Dihydro-S1P nachgewiesen werden (**Abbildung 43 C**). Im Gegensatz dazu wurden in Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs um die 82,75 ± 11,16 pmol Dihydro-S1P gemessen.

Da in den Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs das C18:1-Ceramid und Sphingosin (aus dem *salvage*-Stoffwechselweg) signifikant erhöht waren, interessierten wir uns für die zellulären Konzentrationen anderer Ceramide und Sphingosine.

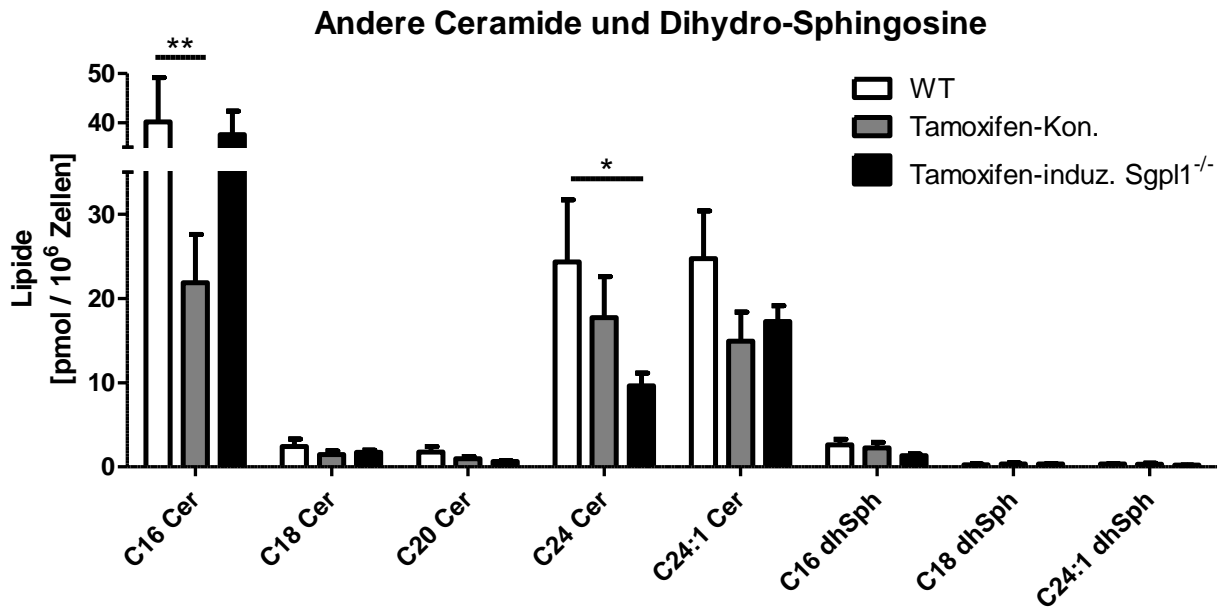


Abbildung 44: Weitere Sphingolipide aus Tamoxifen-induzierten SPL-defizienten KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus den drei Gruppen (siehe **Abbildung 40**) wurden für 18 h inkubiert. Lipide wurden aus den Zellen extrahiert und die Konzentrationen von weiteren Ceramiden (Cer) und Dihydro-Sphingosinen (dhSph) durch LC-MS/MS bestimmt. Die jeweiligen Mengen wurden auf die Gesamtzellzahl normalisiert. Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. n=3.

Aus **Abbildung 44** ist zu erkennen, dass die SPL-Herunterregulation durch Tamoxifen keine Erhöhung von weiteren Ceramiden oder Dihydro-Sphingosinen bewirkte. Im Gegenteil, die C24-Ceramide waren sogar signifikant vermindert gegenüber dem WT. Des Weiteren bewirkte Tamoxifen, dass die C24:1-Ceramide in ihren zellulären Konzentrationen tendenziell zurückgehen, da dies auch in der Tamoxifen-Kontrollgruppe zu beobachten ist. Dagegen war das C16-Ceramid ausschließlich in dieser Gruppe erniedrigt.

Wie die Milzzellen, sollten auch stimulierte KM-DCs aus den drei untersuchten Maus-Gruppen auf ihre funktionelle Eigenschaft im Hinblick auf die Produktion der mRNA und Sekretion von IL-12p70 analysiert werden. Die KM-DCs wurden zusätzlich mit dem TLR9-Ligand, CpG, stimuliert.

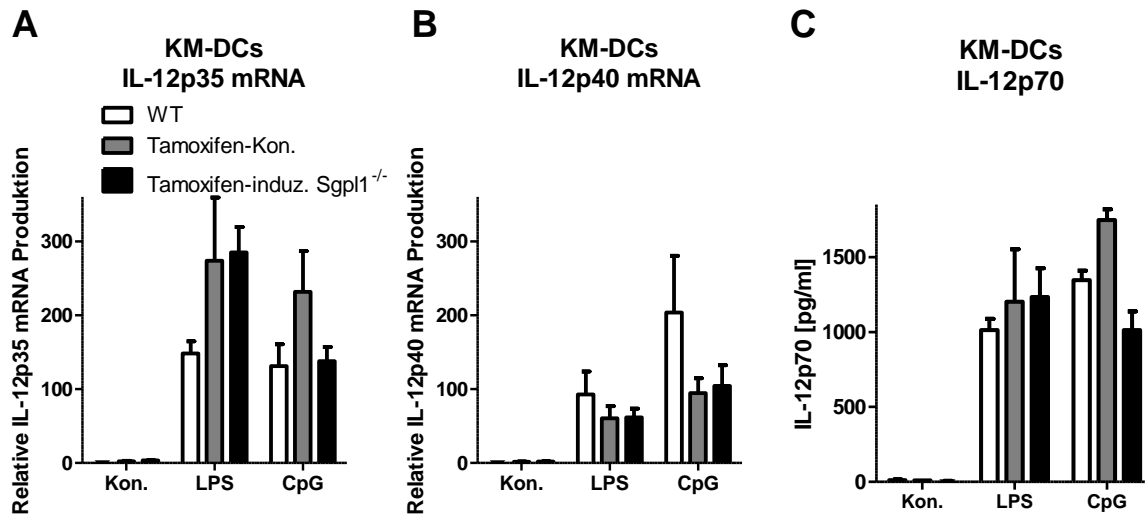


Abbildung 45: Expression und Sekretion von IL-12p70 aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten KM-DCs.

Differenzierte KM-DCs aus den drei Gruppen (siehe **Abbildung 40**) wurden mit 1 µg/ml LPS oder 1,25 µM CpG für 18 h stimuliert oder unbehandelt gelassen (Kon.). Aus der isolierten RNA wurde die umgeschriebene cDNA auf die Expression von **(A)** IL-12p35 oder **(B)** IL-12p40 mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht. In **(C)** wurden die IL-12p70 Konzentrationen aus dem Überstand mit Hilfe eines ELISAs durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde durch 2way ANOVA ermittelt. n=3.

Das Muster der IL-12p35 Expression aus den LPS- und CpG-stimulierten DCs ist mit ihrer Sekretionsmenge des Heterodimers IL-12p70 in den unterschiedlich behandelten Maus-Gruppen vergleichbar (**Abbildung 45 A und C**). Auch hier kann man von einer Tamoxifen-abhängigen IL-12p70 Induktion ausgehen, wenngleich in den Milzzellen dieser Effekt auf Protein-Ebene des Zytokins nach LPS-Gabe deutlicher war. Die SPL-Herunterregulation durch CpG im WT- oder durch CpG und Tamoxifen in den induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs bewirkte vergleichbare Mengen der p35 Expression, was sich auf Protein-Ebene wieder voneinander abhebt. Die p40 Expression aus beiden Tamoxifen-behandelten KM-DC-Gruppen war gegenüber dem WT verringert (**Abbildung 45 B**).

Vergleicht man schließlich die *in vitro*- und *in vivo*-Methode der Tamoxifen-induzierten S1P Lyase-Reduktion miteinander, ähneln sich diese in der verbleibenden Expression der SPL, sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten Zellen. Im *in vitro*-Modell befindet sich die SPL mRNA schon nach 14 h Tamoxifen-Gabe am untersten Limit. In

dieser kurzen Behandlungszeit durch Tamoxifen ist die SPL-Enzymaktivität wahrscheinlich noch vorhanden. Aufgrund dessen produzieren die *in vitro*-Tamoxifen-induzierten Sgpl1^{-/-}-KM-DCs über die Zeit von 72h nur geringfügig größere Mengen an intrazellulärem S1P als WT-Zellen. Die DCs aus der *in vivo*-Tamoxifen-Behandlung zeigen hingegen eine enorme intrazelluläre S1P-und Sphingosin-Akkumulation. Es muss erwähnt werden, dass im *in vivo*-Modell die Mäuse über fünf Tage mit Tamoxifen behandelt wurden, was sich jedoch in ein *in vitro*-Versuch kaum übertragen lässt, da die KM-DCs nach dieser Zeit massiv absterben.

4.3.6 Hemmung der S1P Lyase durch 4-Deoxypyridoxin *in vitro*

Um die S1P Lyase auf Protein-Ebene *in vitro* zu hemmen, wurden DCs mit steigenden Dosen von 4-Deoxypyridoxin (4-DOP) mit und ohne LPS behandelt. 4-DOP ist ein Vitamin B6-Antagonist und hemmt somit die Aktivität der Pyridoxal-Phosphat-abhängigen S1P Lyase. Da es zu diesem Zeitpunkt keinen spezifischen Antikörper gegen die S1P Lyase gab, konnte der direkte Effekt von 4-DOP auf die Enzym-Hemmung nicht untersucht werden. Stattdessen sollte die Auswirkung auf die IL-12p70 Produktion analysiert werden, da Tamoxifen mögliche unspezifische Effekte auf die IL-12p70 Sekretion verursachte (s.o.).

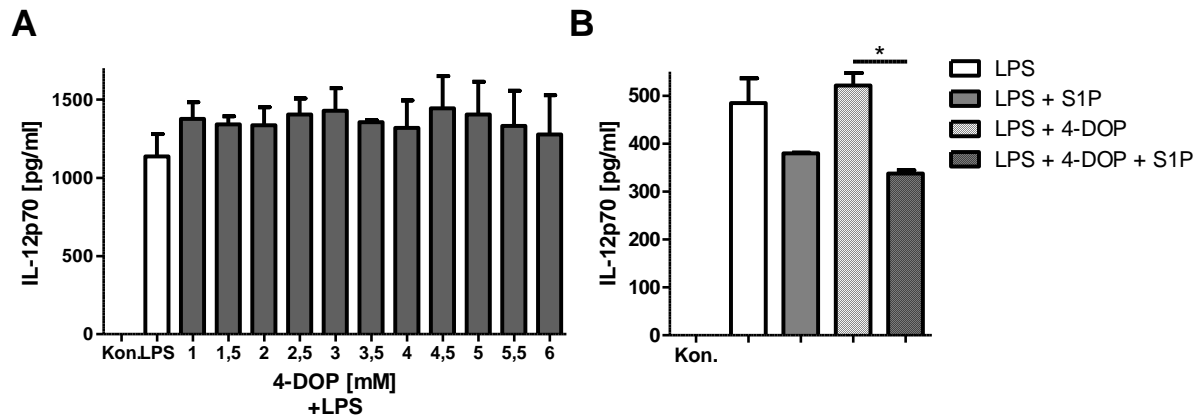


Abbildung 46: IL-12p70 Sekretion aus WT-KM-DCs, welche mit LPS und 4-Deoxypyridoxin inkubiert wurden.

Differenzierte WT-KM-DCs wurden in (A) mit 1 µg/ml LPS oder zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 4-Deoxypyridoxin (4-DOP) für 20 h stimuliert. In (B) wurden die Zellen mit 1 µg/ml LPS, 1 µg/ml LPS mit 1 µM S1P, 1 µg/ml LPS mit 0,5 mM 4-DOP oder 1 µg/ml LPS mit 1 µM S1P und 0,5 mM 4-DOP für 20 h stimuliert. Die Überstände wurden für die Messung der IL-12p70 Konzentration mittels ELISA genutzt. Statistische Signifikanz wurde per 1way ANOVA ermittelt. n=2.

Die Stimulation der BM-DCs mit LPS und 4-DOP löste schon ab der niedrigen 4-DOP-Konzentration von 1 mM eine leichte Erhöhung von IL-12p70 aus (**Abbildung 46 A**). Die erste hier verwendete 4-DOP-Konzentration von 1 mM richtet sich nach der Arbeit von Berdyshev et al. (Berdyshev et al., 2011a). Höhere Mengen an 4-DOP hatten keinen zusätzlichen Effekt. Die Zugabe von extrazellulärem S1P zu den LPS-stimulierten Zellen hemmt bekanntlich die IL-12p70 Sekretion (**Abbildung 46 B**). Durch die Ko-Inkubation mit 4-DOP sollte die Aktivität von SPL gehemmt und der IL-12p70 hemmende Effekt durch die Wirkung des akkumulierten intrazellulären S1P eventuell vermindert werden, was nicht verifiziert werden konnte. Kontroll-Untersuchungen mit S1P oder 4-DOP alleine ergaben keine IL-12p70 detektierbaren Mengen.

5 Diskussion

Durch die intensive Erforschung der Sphingolipide in zellulären Vorgängen wurden Meilensteine auch in immunmodulierenden Wirkungen gesetzt (Spiegel and Milstien, 2011). Viele aktuelle Studien zeigen, dass S1P nicht nur für die Migration von Lymphozyten aus dem Gewebe zuständig ist, sondern auch als ein sekundärer intrazellulärer Messenger fungiert (Van Brocklyn, J R et al., 1998; Spiegel and Milstien, 2011). S1P wird zunehmend wichtig bei der Erforschung von physiologischen und pathologischen Prozessen. Aus diesem Grund wurden für S1P schon einige intrazelluläre Targets postuliert (Olivera and Spiegel, 1993; Hait et al., 2009; Alvarez et al., 2010). Es ist bekannt, dass das Enzym SphK1 schon sehr früh durch eine Zell-Aktivierung erhöht wird und –nach Translokation zur Plasmamembran– S1P in höherem Maße produziert (Cuvillier et al., 1996; Wadgaonkar et al., 2009). Jedoch wurde die Expression anderer Sphingolipid-Enzyme nach einer Stimulation bisher nur geringfügig gezeigt (Mechtcheriakova et al., 2007). Um die Funktion des intrazellulären S1P genauer zu verstehen, ist die Analyse der Regulation S1P-metabolisierender Enzyme von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde die S1P Lyase, als das Enzym, welches S1P irreversibel degradiert und somit eine wichtige Funktion zur Aufrechterhaltung der S1P-Konzentration erfüllt, auf die Expression hin untersucht. Ein Ausschalten der S1P Lyase bewirkt nicht nur eine Blockade in der Lymphozyten-Migration aufgrund erhöhter S1P-Spiegel in Gewebe und Blut (Schwab et al., 2005), sondern auch unter anderem eine Erhöhung von Neutrophilen (Allende et al., 2011) und eine geringere T-Zell-Entwicklung (Vogel et al., 2009). Jedoch haben 10% der S1P Lyase-Aktivität schon ausgereicht, um die Mäuse vor letalen Läsionen zu schützen (Vogel et al., 2009). In dieser Arbeit wurden auch andere für die S1P-Konzentration maßgebenden Enzyme (SphK1, SphK2 und SPP1) untersucht. Folglich wurde die aufgeklärte Regulation dieser Enzyme mit dem aktivierungs-induzierten Zelltod der murinen DCs in Verbindung gebracht. Die Diskussion ist, wie der Ergebnisteil, in drei Abschnitte aufgeteilt und jeder Abschnitt wird im Folgenden näher erläutert.

5.1 Einfluss der TNF- α -Stimulation auf die Zytokinsekretion muriner KM-DCs

Das Interesse an der Rolle des intrazellulären S1P ist in den letzten zwanzig Jahren enorm gewachsen. Dies resultiert unter anderem aus der Tatsache, dass es als sekundärer Messenger eine Reihe wichtiger zellulärer Funktionen ausübt (Payne et al., 2002). Beispielsweise ist es an der Zellproliferation und Überleben der Zelle beteiligt. Außerdem wird SphK durch Wachstumsfaktoren und manche Zytokine, wie TNF- α , aktiviert Sphingosin zu phosphorylieren und auf diese Weise die Menge des intrazellulären S1P zu erhöhen. Für diesen Abschnitt der Arbeit war die Studie von Alvarez *et al.* maßgebend: Das durch SphK1 produzierte intrazelluläre S1P wurde in der TRAF2/RIP1/NF- κ B-Signalkaskade als ein Ko-Regulator der TRAF2-E2-Ligase und somit als Verstärker dieses Signalweges beschrieben (Alvarez et al., 2010). Diese Studie impliziert also, dass das intrazelluläre S1P in pro-inflammatorischen Immunreaktionen beteiligt ist, welche in folgeschweren Autoimmunerkrankungen resultieren können. Andererseits wurde in unserer Arbeitsgruppe eine, ausschließlich auf IL-12p70 bezogene, anti-inflammatorische Rolle des extrazellulär wirkenden S1P über den S1PR₁ aufgedeckt (Schröder et al., 2011). Da IL-12p70 ein antitumorales Zytokin ist, welches durch extrazelluläres S1P nach einer akuten Entzündungsreaktion in DCs (ausgelöst durch LPS) vermindert wird, kann das extrazelluläre S1P folglich prokanzerogene Effekte aufweisen. Während einer akuten Entzündungsreaktion werden jedoch unterschiedliche Zytokine produziert, unter diesen auch TNF- α . Es ist bisher nicht bekannt welche Auswirkungen TNF- α und LPS auf die TRAF2/RIP1/NF- κ B-Signalkaskade und die TRAF6-vermittelte IL-12p70 Produktion in murinen DCs haben. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die TNF- α -oder LPS-induzierte IL-6 Produktion aus primären intestinalen glatten Ratten-Muskulaturzellen (RISM-Zellen) durch den Inhibitor der Sphingosinkinasen, DMS (N,N Dimethylsphingosin), vermindert wird (Gurgui et al., 2010). Dies wurde sowohl für die mRNA als auch für das sezernierte IL-6 Zytokin gemessen. Zusätzlich erhöhte TNF- α die katalytische Aktivität der SphK, welche eine Translokation von NF- κ B zum Zellkern bewirkte. Dadurch wurde die Rolle des intrazellulären S1P in der TNF- α -vermittelten IL-6 Produktion mittels Aktivierung des NF- κ B bestätigt. Wir untersuchten zusätzlich die Wirkung von beiden Stimulanzen, TNF- α und LPS, auf die Produktion von IL-12p70. Hier war die

Eigenschaft des intrazellulären S1P als Verstärker des Signalweges von Interesse. Da es an dem TRAF2/RIP1/NF- κ B-Signalweg nach TNF- α -Stimulation beteiligt sein soll, wurde untersucht, ob das aktivierte TRAF2 mit TRAF6 (durch LPS aktiviert) interagieren und dadurch die IL-12p70 Sekretion positiv moduliert werden kann. Einige Studien berichten, dass diese beiden Moleküle interagieren oder einen Komplex ausbilden können (Chung et al., 2002; Fujino et al., 2007; Sasai et al., 2010; Ogolla et al., 2013): Die CD40-vermittelte anti-mikrobielle Aktivität von Makrophagen und Mikrogliazellen ist abhängig von PKR (RNA-abhängige Protein Kinase) (Ogolla et al., 2013). Dabei wurde die Phosphorylierung von PKR durch eine Ko-Immunopräzipitation von TRAF2 mit TRAF6 gezeigt. Weiterhin bildet ASK1 („apoptosis signal-regulating kinase 1“) nach ROS („reactive oxygen species“)-Stimulation einen hochmolekularen Komplex durch die Rekrutierung von TRAF2 und TRAF6 aus (Fujino et al., 2007). Eine weitere Studie belegte, dass TRAF2 und TRAF6 an die N-terminale Region von TICAM binden und als eine E3-Ligase die K63-Ubiquitinierung ausüben. Dadurch wird ein IFN-induzierter Signalweg in Gang gesetzt, welcher unabhängig von TRAF3 ist (Sasai et al., 2010).

Durch eine nachgeschaltete TNF- α -Inkubation der DCs konnte ein –im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation– verstärkter Effekt auf die IL-12p70 Produktion beobachtet werden (**Abbildung 5**). Jedoch wurden zur Kontrolle SphK1-defiziente DCs herangezogen, welche zeigten, dass diese Verstärkung vom SphK1/S1P_i unabhängig war. Während die Defizienz von SphK1 und 2 eine embryonische Letalität zur Folge hat, bringt die Defizienz einer der beiden Enzyme keine phänotypischen Veränderungen mit sich, was impliziert, dass SphK1 und 2 sich gegenseitig ersetzen können (Alemany et al., 2007). Wenn also die IL-12p70 Verstärkung nicht von SphK1 abhängig war, könnte diese von SphK2 beeinflusst werden. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6, welches in hohen Mengen nach der TNF- α -Stimulation sekretiert wird, wurde weiterhin als Kontrolle gemessen. Den Ergebnissen war nicht eindeutig zu entnehmen, dass TNF- α im Vergleich zur LPS-Stimulation die IL-6 Produktion positiv beeinflusst (**Abbildung 7 A-C**). Eine Verstärkung des IL-6 Effektes trat lediglich nach der Ko-Inkubation mit CpG auf (**Abbildung 7 D**). CpG aktiviert TLR9, welches wiederum MyD88 und die nachgeschaltete Signalkaskade rekrutiert. Nach einer LPS-Stimulation werden jedoch sowohl TRIF- als auch MyD88-Moleküle induziert, was eine schwächere Aktivierung von

TRAF6 auslösen könnte. Im Gegensatz dazu konnten TNF- α + CpG die vorher untersuchte IL-12p70 Sekretion nicht verstärken (**Abbildung 6**). Aus diesem Grund sollten typische Effekte des TNF- α (K63-verlinkte Polyubiquitinierung, IL-6 Produktion und Apoptose) in murinen ausdifferenzierten KM-DCs untersucht werden. Die erfolgreiche Etablierung des Ubiquitin-Assays bestätigte, dass die K63-Polyubiquitinierung nach LPS + TNF- α -Ko-Inkubation an dem RIP1/TRAF2-Komplex tendenziell stattfindet (**Abbildung 8**). Die Überprüfung der unterschiedlichen TNF- α -Konzentrationen ergab eine gesteigerte IL-6 Produktion durch 100 ng/ml TNF- α zusammen mit IL-1 β + IFN- γ (**Abbildung 9**), obwohl die vorher verwendeten 10 ng/ml TNF- α nach Richtwerten aus der Literatur gewählt wurden (Gurgui et al., 2010; Ma et al., 2010). Möglicherweise war diese TNF- α -Konzentration zu gering um die SphK1-Aktivität und somit die Menge an intrazellulärem S1P zu intensivieren. Die Studie von Gurgui *et al.* zeigte dagegen, dass 10 ng/ml TNF- α sehr wohl für eine gesteigerte SphK-Aktivität ausreichen. Im Ergebnisteil unter 4.3.3 wurde die intrazelluläre S1P-Konzentration bestimmt, welche sowohl in unstimulierten als auch in LPS-stimulierten Zellen nach 24 h um die $2 \pm 1,03$ pmol S1P pro 1×10^6 Zellen betrug (**Abbildung 26**). Zwar ist die S1P Lyase-Aktivität in LPS-behandelten Zellen niedriger als in den unstimulierten DCs (**Abbildung 24**), die extrazelluläre S1P-Menge ist jedoch zu Beginn der Inkubation wahrscheinlich um ein Mehrfaches größer als die des intrazellulären S1P (Kurano et al., 2014). Da in dem Zellüberstand kein ApoM als Träger für S1P vorhanden ist, wird dieses S1P innerhalb von 4 h abgebaut oder es bindet an dessen Rezeptor (Yatomi, 2008). Im letzteren Fall wird durch Bindung an S1PR₁ die negative Regulation des IL-12p70 eingeleitet. Aus diesem Grund könnte dieser Effekt selbst durch eine Ko-Stimulation mit TNF- α nicht umgekehrt werden. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass das aktivierte SphK1 in den Extrazellularraum transportiert werden kann (Ancellin et al., 2002). Dabei ist die Menge an extrazellulärem Sphingosin ein limitierender Faktor der SphK1-Aktivität. Dies könnte ebenfalls zur verminderten IL-12p70 Produktion beisteuern. Des Weiteren resultierte die Blockade von TNF- α durch spezifische Antikörper in einer übermäßigen Produktion von Serum-IL-6, -IL-17A und -IL-22 und einer Haut-Entzündung bei Mäusen (Ma et al., 2010). Demzufolge vermittelt TNF- α nicht ausschließlich pro-inflammatorische Effekte. Jedoch lieferte der Vergleich zwischen TNF- α -stimulierten und nicht TNF- α -behandelten DCs hinsichtlich der späten Apoptose

durch 7-AAD-positive Zellen keinen Unterschied (**Abbildung 10**). Ein weiterer Grund für die fehlende IL-12p70 Erhöhung der TNF- α - und LPS-stimulierten DCs könnte schlussendlich die fehlende Interaktion von TRAF2 mit TRAF6 sein. Hinweise hierzu lieferte eine Studie über die molekularen Mechanismen des TRAF6-Signaling (Ye et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Richtungen der gebundenen Peptide durch TRAF2 und TRAF6 eine Differenz von 40° A aufweisen. Dies lieferte sodann weitere Annahmen über die strukturellen und funktionellen Unterschiede der beiden Moleküle. Trotz dessen wurde in diesem Teil der Arbeit ein Hinweis der Interaktion dieser Moleküle nach Analyse der K63-Ubiquitinierung tendenziell sichtbar. Denn die LPS- und TNF- α -Ko-Stimulation lieferte ein im Vergleich zur TNF- α -Inkubation stärkeres Bandenmuster (**Abbildung 8**). Dies könnte durch die Aktivierung des TRAF6 und eine Interaktion der Ligasen von TRAF2 und TRAF6 zustande gekommen sein. Allerdings sollte diese Annahme in weiterführenden Experimenten näher analysiert werden. Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit der intrazelluläre pro-inflammatorische S1P-Effekt nicht eindeutig vom extrazellulären S1P-Effekt auf Basis der TNF- α -Ko-Stimulation abgehoben werden. Zudem wirft die Studie von Alvarez *et al.* Zweifel auf, ob das intrazelluläre S1P in die TNF- α -vermittelte IL-6 Produktion implementiert ist. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse wurde mit Experimenten des zweiten Teils der Arbeit begonnen und der Fokus der Arbeit verstärkt auf den zweiten und dritten Teil gelegt.

5.2 Erweiterung der S1P_e-beeinflussten IL-12p70 Hemmung und dessen Neutralisation durch Spiegelmer

Während der Effekt des intrazellulären S1P im ersten Teil der Arbeit nicht bestätigt werden konnte, wurde in diesem Abschnitt der Befund verifiziert, dass das durch SphK1-gebildete extrazelluläre S1P die IL-12p70 Produktion aus murinen GM-CSF-differenzierten DCs hemmt (Schröder et al., 2011; Schaper et al., 2014) (**Abbildung 11**). Zudem wurde dieser Befund erweitert und gezeigt, dass dieser Effekt ausschließlich in den C57BL/6-Mäusen auftritt. Im Gegensatz dazu ist der negative Loop des extrazellulären S1P in den BALB/c-DCs ausschließlich in Kombination mit der CpG-

Stimulation zu erkennen. Eine weitere Ausweitung dieses ursprünglichen Befunds konnte durch eine zeitabhängige, tendenzielle Blockade sowohl von IL-12p35 mRNA als auch von IL-12p70 durch extrazellulär zugegebenes S1P gezeigt werden (**Abbildung 13**). Außerdem haben diese Untersuchungen eindeutig darauf hingewiesen, dass S1P auch in geringeren Konzentrationen (250 nM) als bisher angenommen angewandt werden kann, um die IL-12p70 Produktion zu hemmen (**Abbildung 13**). Zeitabhängige Analysen deuteten darauf hin, dass die IL-12p35 mRNA-Hemmung schon nach 14 bis 18 h Inkubation durch die beiden Konzentrationen des S1P zu beginnen scheint. Im Vergleich dazu ließ sich der signifikante Unterschied zwischen den LPS- und LPS + S1P-ko-stimulierten Zellen beim ursprünglichen Befund lediglich nach 20 h beobachten (Schröder et al., 2011). Hervorzuheben sind S1P_e-Effekte auf die IL-6 Sekretion: Es wurden keine starken Unterschiede im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation gemessen. Jedoch wurde in der Literatur erwähnt, dass hohe S1P-Konzentrationen (ab 1 µM) in die Zellen gelangen und dort die zellulären Vorgänge beeinflussen können (Alvarez et al., 2010). Es wurde angenommen, dass das extrazellulär zugesetzte S1P in der Zelle dann den TRAF2/RIP1-Signalweg verstärken könnte. Jedoch bewirkten S1P-Konzentrationen von 1 µM eine schwache, dennoch signifikante IL-6 Hemmung. Der negative Loop des extrazellulären S1P in dessen hoher Konzentration ist also auch für die IL-6 Freilassung aus den DCs denkbar. In geringeren Konzentrationen des S1P (250 nM) dagegen war die IL-6 Sekretion nach 18 h Stimulation tendenziell angehoben. Dies spricht dafür, dass IL-6 erst durch hohe Mengen des S1P negativ reguliert werden kann. Die Ergebnisse der IL-12p70 Reduktion durch S1P_e dienten sodann als Basis für weiterführende Experimente zur Austestung der S1P-neutralisierenden Spiegelmer. Nach Bestätigung, dass die Spiegelmer in einer Konzentration von 500 nM die intrazellulären Calcium-Mengen aus HEK-Zellen beeinträchtigten (**Abbildung 14**), konnten weitere Analysen an murinen DCs erfolgen. Nach der Ko-Inkubation mit dem Spiegelmer, sowohl ohne als auch mit zugesetztem exogenem S1P, zeigte sich eine milde konzentrationsabhängige Steigerung von IL-12p70 (**Abbildung 15**). Jedoch stiegen auch die Zytokin-Mengen der Zellen an, welche mit dem Kontroll-Spiegelmer inkubiert wurden. Dies implizierte eine unspezifische Wirkung der Spiegelmer auf KM-DCs. Da die Effekte relativ schwach und teilweise unspezifisch waren, wurden darauf Ko-Inkubationen mit IFN-γ angestellt.

Dadurch konnten die IL-12p70 Mengen, abhängig von der verwendeten Konzentration, um ein vielfaches erhöht werden (**Abbildung 16**). Damit die IL-12p70 Produktion nicht am oberen Limit angelangt, wurde in den Folge-Experimenten weniger LPS eingesetzt und zusammen mit IFN- γ mit und ohne Spiegelmere stimuliert. Man konnte wiederum eine Tendenz in Richtung positiver Modulation des IL-12p70 nach Gabe der Spiegelmere beobachten. Der Grund warum die Spiegelmere nicht den gewünschten signifikanten Effekt verursachen, kann der sein, dass diese durch 40 kDa-Polyethylenglycol (PEG) stabilisiert werden. Dies ist ein großes Molekül und könnte folglich nicht in die Tasche des S1PR₁ passen. Durch aufwendige Analysen mittels Röntgen- und Mikrostrahlen wurde inzwischen die Kristallstruktur des S1PR₁ aufgedeckt. Es konnte gezeigt werden, dass die Ligandenbindedomäne dieses Rezeptors nur geringfügig zugänglich ist (O'Sullivan and Dev, 2013). Diese befindet sich in einer Tasche, welche durch ihre Position (nah an der Plasmamembran), durch die enge Anordnung der extrazellulären Schleifen („loops“) und durch einen helikalen „Deckel“ die Ligandenbindung stark einschränkt. Trotz dessen konnte die S1P-vermittelte β -Arrestin-Rekrutierung in CHO („Chinese-hamster ovary“)-Zellen durch Spiegelmere gehemmt werden (Purschke et al., 2014). Auch in HUVEC-Zellen („human umbilical vein endothelial cells“) wurde die Angiogenese, welche durch S1P und weitere Wachstumsfaktoren induziert wird, durch Spiegelmere blockiert. Die Dissoziationskonstante von gebundenem Spiegelmer am S1P beträgt dabei 4,3 nM. Zusammenfassend konnte die S1P_e-vermittelte IL-12p70 Hemmung in mehrerer Hinsicht erweitert werden: Zum einen sind Unterschiede im genetischen Hintergrund der SphK1-defizienten Mäuse maßgebend an der LPS-bzw. CpG-induzierten IL-12p70 Reduktion beteiligt, welche in weiterführenden Studien berücksichtigt werden sollten. Weiterhin wird die IL-12p35 mRNA nicht nur aus defizienten Tieren moduliert sondern auch durch Konzentrationen von 0,25 bis 1 μ M des exogen zugegebenen S1P in WT-Zellen. Jedoch wird die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 erst durch 1 μ M S1P gehemmt. Trotz der bestätigten anti-inflammatorischen Wirkung des extrazellulären S1P konnten die Spiegelmere dessen negativen Effekt auf die IL-12p70 Sekretion aus KM-DCs nicht eindeutig neutralisieren. Da aufgrund der durchgeführten Experimente zum intra- und extrazellulären S1P nun das Interesse an der Regulation

der S1P Lyase nach einer TLR-vermittelten Stimulation lag, wurde der Schwerpunkt der Arbeit darauf gelegt.

5.3 Regulation der S1P-relevanten Enzyme durch TLR-Induktion und deren Assoziation mit dem aktivierungs-induzierten Zelltod dendritischer Zellen

Die Untersuchungen der S1P Lyase-Regulation standen in diesem Teil der Arbeit im Mittelpunkt. Viele Studien belegen eine entscheidende Rolle der SPL in unterschiedlichen humanen Erkrankungen, wie Krebs und autoimmune, neurodegenerative, kardiovaskuläre und infektiöse Erkrankungen sowie in inflammatorischen Vorgängen (Kumar and Saba, 2009; Vogel et al., 2009; Allende et al., 2011). Die SPL wurde zunächst aus der Hefe kloniert („dihydrosphingosine phosphate lyase“; DPL1). Danach hat man die homologe SPL auch in anderen Spezies, wie *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* und *Homo sapiens* entdeckt. Die humane SPL kodiert für 568 Aminosäuren und zeigt eine 84%ige Aminosäure-Identität und 91%ige Ähnlichkeit zu der SPL aus der Maus (Van Veldhoven, P P et al., 2000). Die SPL ist in Membranen des ER lokalisiert und enthält eine Transmembrandomäne, welche sich nah am N-Terminus befindet. Die N-terminale Domäne ist im ER-Lumen lokalisiert, während die C-terminale Domäne zum Zytosol hin gerichtet ist. Außerdem besitzt die C-terminale Domäne die katalytische Aktivität der SPL. Die Expression/Aktivität der SPL findet hauptsächlich im Dünndarm, Kolon, Thymus, Milz und in der Harder'schen Drüse der Mäuse und Ratten statt, wobei in Leber, Niere, Lunge, Magen und in den Hoden SPL weniger exprimiert wird (Kumar and Saba, 2009). SPL wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert: In Nematoden und Menschen regulieren Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie die SPL-Expression auf der transkriptionellen Ebene (Oskouian et al., 2005). Die SPL-Transkription wird auch durch PDGF gesteuert (Chen et al., 2004; Schmahl et al., 2007). Zusätzlich wurde das Gen *sgpl1* als Ziel für eine mikroRNA (mir-125b) in Prostata-Krebs-Zellen entdeckt (Shi et al., 2007). In einer Promotorstudie des *sgpl1*-Gens (und anderer im Thymus hoch exprimierter Gene) wurden –zur Analyse vorkommender Immunsystem-Gene– gemeinsame *cis*-Elemente mit frühem Wachstumsfaktor, Zink-Bindeprotein-Faktor und GC-Box-Faktor-Motiven gefunden

(Hutton et al., 2004). Auch posttranslationale Modifikationen von humaner SPL wurden vorgeschlagen, welche durch ein Screening nitrosylierter Proteine entdeckt wurden (Zhan and Desiderio, 2006). Weiterhin war die Stimulation der tumorigenen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 mit dem Phytoöstrogen Genistein und einem Wurzelextrakt ausreichend, um die SPL und SphK2 heraufzuregulieren (Engel et al., 2012). Diese Befunde legen nahe, dass, obwohl die SPL noch nicht vollständig erforscht werden konnte, diese in Immunfunktionen essentiell ist. Außerdem sind Deregulationen der S1P-Konzentration sehr ausschlaggebend für die Entwicklung von autoimmunen Erkrankungen (Snider, 2013), wie Arthritis (Lai et al., 2010; Takeshita et al., 2012), Multiple Sklerose (Pritchard et al., 2014) und Systemische Sklerose (Le Huu et al., 2013). Um eine gesunde Balance zu bewahren, muss S1P durch dessen generierende und degradierende Enzyme in unterschiedlichen intra- und extrazellulären Kompartimenten reguliert werden. Dies setzt voraus, dass die Expression und Regulation dieser Enzyme genau analysiert und gegebenenfalls für therapeutische Zwecke zur Verfügung stehen muss. Da gestörte S1P-Spiegel meistens Immunfunktionen beeinflussen, wurden in dieser Arbeit zur Analyse der Regulation der Sphingolipid-Enzyme murine dendritische Zellen herangezogen. Wir untersuchten die Mechanismen der Sphingolipide und deren Enzyme in aktivierten und in ruhenden DCs, um Aufschluss darüber geben zu können, ob zum einen die Letzteren die Enzyme und Sphingolipide während ihres Lebenszyklus verändern und zum anderen ob eine bakterielle Entzündung die Sphingolipid-Metabolite und Enzyme in eine andere Richtung lenkt. Tatsächlich wurden nach der DC-Aktivierung durch TLR-Liganden veränderte Expressionsmuster sowohl von S1P-generierenden als auch -metabolisierenden Enzymen beobachtet. Durch die TLR-Stimulierung werden Adaptorproteine, wie MyD88 und TRIF rekrutiert (O'Neill, Luke A J et al., 2003; Takeda and Akira, 2004). Diese leiten sodann die Signale zu den Transkriptionsfaktoren weiter (NF- κ B und MAP-Kinasen), welche die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Gang setzten (Chen and Jiang, 2013). Aus diesem Grund wurden die Zytokine IL-12p70 und IL-23 auf mRNA- und Proteine-Ebene dosis-abhängig untersucht (**Abbildung 19 bis Abbildung 23**). Die Ergebnisse zeigen, dass die DCs auf die TLR-Stimulation hin hohe Mengen dieser Zytokine exprimieren und sezernieren können. Dabei scheint IL-12p40 ein limitierender Faktor für die IL-12p70 Produktion nach Aktivierung der membranständigen TLRs (1/2, 5, 2/6) zu sein, da dessen geringere Mengen im

Vergleich zum IL-12p35 in verminderter IL-12p70 Sekretion resultieren. Andererseits werden die beiden Untereinheiten auf mRNA-Ebene nach Aktivierung der endosomal ständigen TLRs (3, 7/8, 9) in ähnlichem Verhältnis zueinander exprimiert. Möglicherweise induzieren sodann diese TLRs höhere Mengen an IL-12p70 aufgrund der räumlichen Nähe zu Signalmolekülen und der Tatsache, dass diese virale und bakterielle RNA und DNA erkennen und die Beseitigung schnell und wirksam in Gang bringen sollen. Nach Stimulation des TLR4 werden ebenfalls höhere Mengen des IL-12p70 detektiert. Wie in der Einleitung erwähnt, wird TLR4 nach Bindung des Liganden weg von der Plasmamembran transloziert (Gangloff, 2012). Es ist daher möglich, dass dieser, ähnlich den endosomalen TLRs, eine stärkere IL-12p70 Produktion aktiviert. Da nach der TLR3-Aktivierung annähernd keine Zytokine produziert wurden, ist eine fehlende oder schwache Expression dieses TLRs möglich. In murinen pDCs und frisch isolierten CD4⁺-DCs wird TLR3 beispielsweise nicht exprimiert (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Die gemessene IL-23 Menge zeigt dagegen, dass eine TLR9-Stimulation die höchsten Werte, verglichen zu anderen TLRs, verursachte. In einer Studie wurde berichtet, dass die Ectodomäne des TLR9 zunächst proteolytisch gespalten werden muss, um einen funktionierenden Rezeptor zu generieren (Ewald et al., 2008). Jedoch können beide Formen den Liganden binden, wobei gezeigt wurde, dass nur die prozessierte Form des TLR9 die Signalweiterleitung in Gang setzt. Es ist daher möglich, dass diese TLR9-Form die IL-23p19-Untereinheit, welche der limitierende Faktor für die IL-23 Sekretion zu sein scheint, stärker aktiviert als die anderen TLRs.

Die Expressionsprofile der S1P-Enzyme wurden bereits in HUVEC-Zellen und Neutrophilen nach einer 24-stündigen LPS-Stimulation untersucht (Mechtcheriakova et al., 2007). Ähnlich diesen Ergebnissen, werden in KM-DCs SphK2- und SPP1 mRNA-Level schwach herunterreguliert (**Abbildung 25 B, C**). Im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die Regulation dieser Enzyme nach einer längeren Stimulationszeit der DCs untersucht. Sowohl SPL (**Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 24**) als auch SPP1, beide S1P-degradierende Enzyme, sind schon während anfänglicher Aktivierung herunterreguliert. Sie erholen sich auch während der 72-stündigen Stimulation nicht mehr wieder. Dies konnte durch einen weiteren TLR-Stimulus (Pam3-TLR1/2) für die Expression von SPL bestätigt werden (**Abbildung 24**). Dass die

SphK1 mRNA frühzeitig nach der Stimulation ansteigt, konnten auch andere Studien, wie die oben erwähnte Studie in Neutrophilen und eine weitere Studie in einem murinen Lungen-Modell (Wadgaonkar et al., 2009) zeigen. Im Unterschied zu SphK2- und SPP1, steigt die SphK1 mRNA während einer 72 h Stimulation drastisch an (**Abbildung 25**). Das zweite S1P-generierende und untersuchte Enzym, die SphK2, dagegen war über die ganze Stimulationszeit hinweg herunterreguliert. Möglicherweise kompensieren die beiden Enzyme einander, weshalb es der Zelle ausreicht nur das eine Enzym hochzuregulieren. Diese Daten könnten dann auf eine Publikation zurückgeführt werden, in der nach einer Defizienz-Induktion von SphK2 dessen Isotyp, SphK1, auf mRNA-Ebene heraufreguliert war (Liang et al., 2013). Die beiden SphK-Enzyme weisen unterschiedliche Funktionen auf, beispielsweise in der immunmodulatorischen Arthritis (Lai et al., 2009). Darüber hinaus wurde in dieser Studie beschrieben, dass eine durch siRNA bewirkte Reduktion der SphK2 pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, TNF- α und IFN- γ) erhöhte. Im Unterschied dazu wurden geringere Serum-Zytokin-Mengen nach siRNA-Gabe gegen SphK1 gemessen.

Um die Studien der S1P-Enzymregulation zu vervollständigen, wurden intrazelluläre Konzentrationen von S1P und Sphingosin nach der DC-Stimulation mit LPS und Pam3 gemessen (**Abbildung 26**). Im Unterschied zu der Studie, in welcher S1P in Neuronen aufgrund einer SPL-Defizienz akkumulierte (Hagen et al., 2009), wurden in der vorliegenden Arbeit verringerte S1P-Mengen über die Stimulationszeit hinweg beobachtet. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu der reduzierten SPL-Menge (auf mRNA- und Enzymaktivitätsebene) sowie den SPP1- und SphK1 mRNA-Daten. Tatsächlich hat die Studie in Neutrophilen und HUVEC-Zellen gezeigt, dass steigende SphK1-Mengen intrazelluläre S1P-Konzentrationen nicht positiv beeinflussen (Mechtcheriakova et al., 2007). In vielen Publikationen ist die hohe Produktion oder Expression der SphK1 ein indirekter Hinweis für S1P-Akkumulationen. Dies konnte hier jedoch nicht bestätigt werden. Es ist durchaus möglich, dass der gegenteilige Effekt auftritt: Die niedrigen S1P-Mengen könnten eine SphK1-Expression erhöhen. Zusätzlich ist es notwendig Enzym-Aktivitäten der SphK1 und weiterer Enzyme zu messen, um weitere Schlüsse der DC-Aktivierung ziehen zu können. Da zum Zeitpunkt von 48 bis 72 h in den Zellen eine späte Apoptose gemessen wurde, ist es möglich, dass die Zellen

es nicht mehr schaffen SphK1 in das aktive Enzym zu transkribieren. In Erwägung zu ziehen ist auch, dass die Zellen versuchen sich durch die beschriebene SphK1/S1P/S1PR₁-Achse vom Zelltod zu „retten“ und aus diesem Grund SphK1 heraufregulieren. Ein weiterer Grund für die niedrigen S1P-Konzentrationen in der Zelle kann ein möglicher aktiver Transport des S1P in den Extrazellularraum durch das ABC-System sein. Wie in der Einleitung geschildert, wurde für S1P ein aktiver Transport in vielen Studien und Reviews eingehend beschrieben (Liu et al., 2012; Nishi et al., 2014). Tatsächlich wurde gruppenintern ein möglicher S1P Transport mittels des ABCB1a-Transporters auf mRNA-Ebene über die lange LPS-Stimulationszeit der DCs gemessen. ABCB1a wurde zuvor in einigen Studien als ein effektiver Transporter für S1P belegt (Honig et al., 2003; van de Ven, Rieneke et al., 2006). Das intrazelluläre S1P der DCs spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle in dem „inside-out signaling“. Einen Hinweis darauf lieferte die zuvor gewonnene Erkenntnis aus der eigenen Gruppe, dass das durch SphK1 gebildete S1P nach „außen“ transportiert wird, um an den S1PR₁ zu binden und die negative Regulation von IL-12p70 zu induzieren (Schröder et al., 2011; Schaper et al., 2014). Auch in dieser Arbeit wurde eine anfänglich hohe IL-12p70 Produktion der DCs nach einfacher LPS-Stimulation (nach 8 h) mit der Zeit zunehmend verringert, wenn die IL-12p70 Werte auf die Gesamtzellzahl (nach der Stimulation) normalisiert wurden (**Abbildung 27**). Dies lässt vermuten, dass das extrazelluläre S1P hier die IL-12p70 Expression und Sekretion negativ beeinflusst. Dies sollte aber durch Untersuchungen der extrazellulären S1P-Konzentrationen und der ABC-Transporter auf Protein-Ebene in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Da extrazelluläres S1P sogleich nach dessen Auswärtstransport an HDL oder Albumin bindet, welches das S1P sofort zu den Rezeptoren transportiert (Liu et al., 2012), ist die Bestimmung der S1P_e-Konzentrationen umstritten.

Die ermittelten Mengen an Sphingosin in LPS-stimulierten DCs nach 72 h sind sehr hoch (**Abbildung 26 B**). Dagegen scheint der Stimulus Pam3 keinen Einfluss auf die Sphingosin-Mengen zu haben, da dessen Verlauf dem der unstimulierten Zellen entspricht. Da Sphingosin die Apoptose der Zelle beeinflusst (Cuvillier, 2002), könnte dessen mögliche Quelle das während der Apoptose ansteigende Ceramid sein. Letzteres wurde nach einer LPS-Stimulation und NF-κB-Aktivierung akkumuliert (Franchi

et al., 2006; Chang et al., 2011). Nach Messung der Zellzahlen über die LPS-Simulationszeit hinweg wurde in dieser Arbeit eine verminderte Zellzahl analysiert (**Abbildung 28**). Die Zellen wurden sodann auf Apoptose durch Annexin V- und 7-AAD-Färbung mittels einer FACS-Messung untersucht. Auch hier konnte bestätigt werden, dass nach 48 und 72 h LPS-Stimulation mehr apoptotische Zellen detektiert wurden als in der Kontrollgruppe. Einige Studien, welche die LPS- oder TLR-vermittelte Apoptose der DCs belegen, sollen im Folgenden kurz aufgeführt werden: Für TLR4- und TRIF-defiziente Mäuse, denen LPS *in vivo* gegeben wurde, konnte gezeigt werden, dass der Signalweg über diese beiden Komponenten das Überleben der Milz-DCs reduzierte (Trez et al., 2005). Weiterhin war die Apoptose der Milz-DCs aus TLR2-TLR4-defizienten Mäusen nach polymikrobieller Sepsis inhibiert (Pène et al., 2009). Zusätzlich wurde demonstriert, dass eine LPS-induzierte Aktivierung des CD14 und des Calcium-abhängigen NFATs für die Apoptose der differenzierten DCs wichtig ist, um diese Zellen vor Autoimmunität zu schützen (Zanoni et al., 2009). Dieser Signalweg scheint jedoch unabhängig von TLR4 zu sein. In CD14-positiven Monozyten löst die Aktivierung des PKC- β_2 durch extrazelluläres PMA eine Mitochondrien-abhängige Caspase-Aktivierung und Apoptose aus (Lin et al., 2011). Eine weitere Publikation zeigt, dass möglicherweise ein anderes Molekül, Nur77, in die NFAT-vermittelte Apoptose der DCs involviert ist (Granucci and Zanoni, 2009). Bei dem aktivierungs-induzierten Zelltod der T-Zellen regulieren diese Nur77 herauf, was jedoch in den DCs nicht weiter bestätigt werden konnte (Cheng et al., 1997; Wang et al., 2009). Stattdessen wird MINOR ("mitogen inducible orphan receptor"), als ein Mitglied der Nur77-Familie, beim aktivierungs-induzierten Zelltod der DCs beschrieben, da es hochreguliert wird. In Tumorzellen wird Nur77 zu Mitochondrien transloziert und induziert dort die Cytochrom c Freilassung. Dies führt sodann zur Spaltung der Caspase 3 und zur anschließenden Apoptose der Zellen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Produktion von Caspase 3 und deren aktiver Form untersucht. Durch Western Blot Experimente konnte gezeigt werden, dass die Caspase 3 nach 48 h LPS-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen überwiegend in dessen aktiver Form (17 kDa) vorliegt (**Abbildung 29**).

Darüber hinaus ist es möglich, dass die DCs versuchen eine Balance zwischen Autophagie und Apoptose zu halten, da die LPS-Stimulation auch ER-Stress induziert,

wodurch Autophagie aktiviert werden kann (Zou et al., 2014). Die Depletion von SPP1 induziert ebenfalls Autophagie und hemmt durch eine PERK-abhängige Akt-Phosphorylierung die Produktion des intrazellulären S1P (Lépine et al., 2011b). In dem System der DCs nach LPS-Stimulation kann deshalb Autophagie und somit das Zellüberleben induziert worden sein, da SPP1 massiv herunterreguliert ist. Andererseits kann die Autophagie durch die Spaltung von Atg5 („autophagy-related gene“) in Richtung Apoptose geschaltet werden (Lépine et al., 2011a). In dieser Studie wurde die Doxorubicin-induzierte Zelloptose ebenfalls durch die SPP1-Reduktion drastisch erhöht. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Doxorubicin die Produktion des Ceramids induzierte und dies die Apoptose durch die folgende Atg5-Spaltung noch mehr verstärkte. Es ist also möglich, dass in den spät aktivierten DCs die reduzierten intrazellulären S1P- und stark erhöhten Sphingosin-Konzentrationen einen entscheidenden Beitrag zur Apoptose leisten. Dies wiederum könnte die Herunterregulation von SPP1 –und möglicherweise auch von SPL– weiter triggern. Aus diesem Grund könnte die LPS-Stimulation der DCs über längere Zeit hinweg die Doxorubicin-induzierten Effekte nachahmen und folglich die DC-Autophagie in Richtung Apoptose infolge des S1P-Auswärtstransports und Sphingosin-Erhöhung umlenken. Somit konnte in dieser Arbeit ein entscheidender Beitrag zur Regulation der Sphingolipid-Enzyme und S1P sowie Sphingosin in aktivierten und ruhenden DCs über ihre Lebensspanne hinweg geleistet werden. Die TLR-Induktion zieht nicht nur einen klassischen Zytokinsturm nach sich, sondern ist begleitet von einer komplexen Ko-Regulation des Sphingolipid-Metabolismus (**Abbildung 47**). Diese beiden Prozesse enden sodann in einem aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) der entzündlichen DCs. Somit nehmen die Sphingolipide und ihre Enzyme eine entscheidende Rolle in AICD und autoimmunen Erkrankungen ein. Dieses komplexe Zusammenspiel sollte zukünftig bei Erforschungen der zellulären und systemischen Vorgänge sowie bei weiterführenden therapeutischen Maßnahmen berücksichtigt werden. Beispielsweise, unter Beachtung dieser beobachteten Wechselwirkungen, könnten TLR-Agonisten als Therapie eingesetzt werden (Mifsud et al., 2014). Diese würden die beschriebenen Effekte (SPL- und SPP1 mRNA-Herunterregulation und eventuell S1P-Auswärtstransport, gefolgt von AICD) auslösen und möglicherweise einige Arten von Krebs-Erkrankungen erfolgreich therapieren.

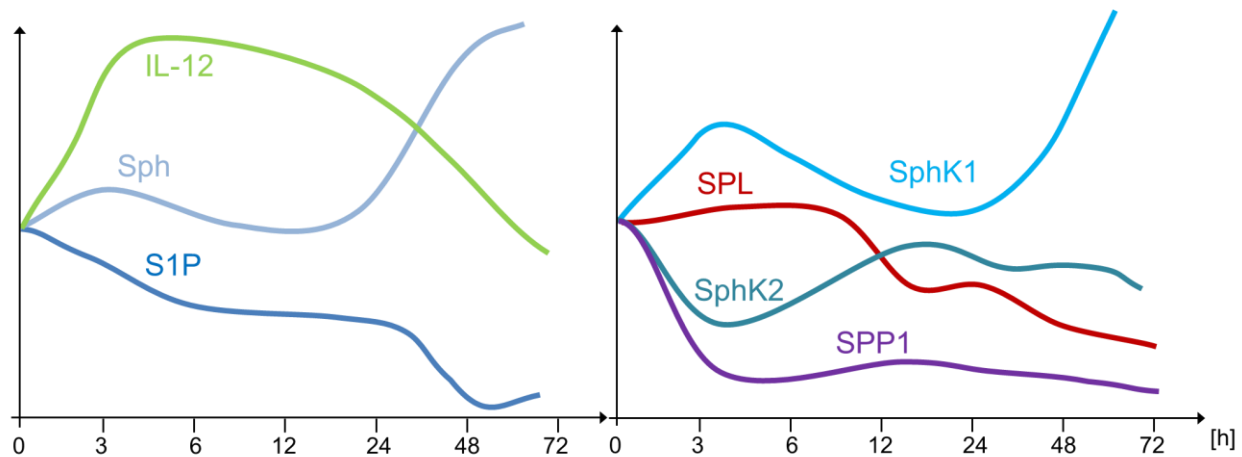


Abbildung 47: Schematische Darstellung zur Übersicht der zeitabhängigen Modulation in KM-DCs.

Differenzierte WT-KM-DCs wurden mit LPS von 0 bis 72 h stimuliert und Sphingosin 1-Phosphat (S1P) sowie Sphingosin (Sph) wurden durch LC-MS/MS quantifiziert. Die Menge von IL-12p70 (IL-12) wurde mittels ELISA und die mRNA Regulation der Enzyme S1P Lyase (SPL), S1P Phosphatase 1 (SPP1) und Sphingosinkinasen 1 und 2 (SphK1 und 2) wurde durch die quantitative Realtime-PCR bestimmt.

Im letzten Teil dieses dritten und größten Abschnitts der Arbeit wurde ein Tamoxifen-induzierbares Cre-Rekombinase-System zur Ausschaltung von SPL sowohl durch die *in vitro*- als auch *in vivo*-Applikation des Tamoxifens ausgetestet. Tamoxifen ist ein selektiver Derivat des Östrogens und hemmt kompetitiv die Östrogenrezeptoren. Es findet auch Einsatz als ein Arzneistoff, beispielsweise bei Brustkrebs (Madeddu et al., 2014). Obwohl durch Tamoxifen einige Nebeneffekte auftreten können, wie beispielsweise eine Reduktion der TLR7-Expression in HCV-infizierten PBMCs (periphere blut-mononukleäre Zellen) männlicher Mäuse (Fawzy et al., 2014), ist das System des induzierbaren Gen-Knockouts mittels Tamoxifen auf Ebene des Cre-Proteins spezifisch (Zhang et al., 2012). Das gewünschte Gen oder Exon kann durch das in den Zellkern translozierte Cre-Protein nur dann ausgeschnitten werden, wenn auch Tamoxifen appliziert wurde. Vorausgesetzt ist in jedem Fall, dass das Cre –bei einer Klonierung in den β -Aktin-Promotor– in jeder Zelle exprimiert und auch tatsächlich in den Zellkern transloziert werden kann. Um Letzteres zu gewährleisten, bindet Cre als ein Fusionsprotein mit mutierter Ligandenbindedomäne an ein Hitzeschockprotein (Hsp90) im Zytoplasma der Zelle. Wird Tamoxifen appliziert, so soll Hsp90 dissoziieren und gleichzeitig durch Tamoxifen-Bindung an die mutierte Ligandenbindedomäne ein Signal zur Translokation in den Zellkern erfolgen. Dort schneidet dann das Cre-

Protein die geflochten Gene/Exons der Gene aus. Es sollte dann nur noch eine LoxP-site verbleiben. Zunächst wurde in dieser Arbeit auf zellulärer Ebene überprüft, ob und wann die ausdifferenzierten KM-DCs nach zeitabhängiger Tamoxifen-Gabe die SPL mRNA herunterregulieren. Bei der 0 h Inkubation mit Tamoxifen ist bereits die Hälfte der SPL mRNA, verglichen zu den beiden Kontrollen, vorhanden (**Abbildung 31**). In diesen Zellen scheint die Cre-Rekombinase also schon vorher aktiviert worden zu sein, entweder aufgrund dessen Sensibilität oder aber aufgrund einer leichten zeitlichen Verschiebung der Ernte der Zellen nach Tamoxifen-Gabe. Nach 14 bis 96 h der Tamoxifen-Inkubation waren 17% der relativen Mengen an SPL mRNA verblieben (**Abbildung 31, Abbildung 32**). Dies kann viele Ursachen haben: Zum Beispiel, ist die SPL durch mögliche Mutationen nicht in jeder Zelle geflocht oder Cre wird möglicherweise in manchen Zellen nicht exprimiert und transkribiert. Über die Lebensdauer der DCs ist die Herunterregulation der SPL durch Tamoxifen mit der durch LPS vergleichbar. Durch Tamoxifen kann man einen geringen Anstieg der S1P-Konzentration nach der Langzeitinkubation beobachten, welcher nach LPS-Stimulation der Zellen aus denselben Mäusen nicht mehr vorhanden ist (**Abbildung 33**). Da in diesen Zellen zu dem späten LPS-Stimulationszeitpunkt auch Sphingosin ansteigt, ist ersichtlich, dass die Apoptose der DCs möglicherweise ausschließlich durch LPS-Stimulation stattfindet (**Abbildung 34**). Aus diesem Grund fehlt in den LPS-unbehandelten Zellen der späte Sphingosin-Schub. Die pro-inflammatorische Induktion der Tamoxifen-induzierten DCs war mit den unbehandelten WT-Zellen vergleichbar, da diese gleich hohe Mengen an IL-12p70 produzierten (**Abbildung 35**). Auch durch die *in vivo*-Verabreichung des Tamoxifens konnte SPL weder in frisch isolierten Milzzellen noch in differenzieren KM-DCs vollständig ausgeschaltet werden (**Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 40, Abbildung 41**). Dabei unterscheiden sich die *in vitro*- und *in vivo*-Methoden klar voneinander: Während die Zellen von 0 bis 96 h mit Tamoxifen behandelt wurden, sollte den Tieren Tamoxifen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht werden, worauf die Zellen aus diesen erst am sechsten Versuchstag isoliert wurden. Während ihrer Differenzierungsphase wurden die KM-DCs jedoch nicht mehr mit Tamoxifen inkubiert. Trotz dessen wurde eine dramatische Akkumulation der Sphingolipide gemessen, welche aus dem *salvage*-Metabolismus (Ceramid, Sphingosin und S1P) und aus der *de novo*-Synthese (Dihydro-Sphingosin und Dihydro-S1P)

stammen (**Abbildung 42, Abbildung 43**). Dies impliziert, dass durch die partielle Ausschaltung der SPL die eben genannten Sphingolipid-Metabolite dereguliert sind und eine Reduktion von 70% ausreicht, um die Sphingolipid-Balance in den Zellen zu zerstören. Andere Lipide, wie die Ceramid-Derivate, waren dagegen nicht mehr im Überschuss in Tamoxifen-induzierten SPL-herunterregulierten DCs vorhanden (**Abbildung 44**). Aus diesen Milzzellen und DCs wird des Weiteren nicht ersichtlich, welche Folgen Tamoxifen und die partielle SPL-Herunterregulation auf deren pro-inflammatorische Kompetenz ausüben. Dies resultiert aus der beobachteten Erhöhung von IL-12p70 auch in den Kontroll-Milzzellen und aus der gleichbleibenden Produktion dieses Zytokins in KM-DCs (**Abbildung 39, Abbildung 45**). Die Ergebnisse liefern jedoch Anhaltspunkte dafür, dass Tamoxifen eine unspezifische pro-inflammatorische Immunantwort in Milzzellen auslöst, da in Kontrollzellen, welche ebenfalls mit Tamoxifen behandelt wurden, eine erhöhte IL-12p70 Menge gemessen worden war. Aus der Literatur ist bekannt, dass Tamoxifen die Ceramidase-Aktivität in einer Reihe unterschiedlicher Krebs-Zellen signifikant hemmt (Morad, Samy A F et al., 2013). Dies könnte also in Anti-Krebs-Therapien gut eingesetzt werden, denn dieses Enzym katalysiert die Bildung von Sphingosin und S1P aus dem Ceramid.

Die Tamoxifen-induzierten SPL-Experimente lassen sich also nicht auf *in vitro*-Versuche übertragen, da die DCs eine Apoptose nach 72 bis 96 h eingehen. Aus diesem Grund wurden KM-DCs mit 4-DOP behandelt, wodurch SPL auf Enzymaktivitätsebene gehemmt und folglich die Menge an IL-12p70 evaluiert werden sollte (**Abbildung 46**). Dieser SPL-Hemmer bewirkte tatsächlich eine leichte IL-12p70 Erhöhung. Jedoch konnte der reduzierende S1P_e-vermittelte Effekt auf IL-12p70 durch die Applikation von 4-DOP nicht aufgehoben werden. Die Ursache dafür kann in einer Erhöhung des intrazellulären S1P aufgrund der SPL-Hemmung und des darauffolgenden Auswärtstransports des S1P liegen. Es könnte sodann zusätzlich zum „inside-out signaling“ die IL-12p70 Produktion negativ beeinflussen. Um in Erfahrung zu bringen, ob intrazelluläres S1P die IL-12p70 Expression und Produktion verstärkt, sollten in weiterführenden Experimenten solche Methoden angewandt werden, in denen S1P nicht aus der Zelle heraustransportiert werden kann. Hierzu empfiehlt sich beispielsweise die Methode des „caged S1P“ (Usatyuk et al., 2011) auszutesten.

6 Ausblick

6.1 Analysen zur weiteren TNF- α - und LPS-induzierten Interaktion von TRAF2 mit TRAF6 durch intrazelluläres S1P in KM-DCs

Um eine mögliche Interaktion zwischen TRAF2 und TRAF6 zu untersuchen, sollten in weiterführenden Experimenten Analysen mit höheren Konzentrationen des TNF- α gemacht werden. Damit würden sich die Effekte stärker von den beobachteten abheben. Dies würde auch aufklären, ob TNF- α und/oder das intrazelluläre S1P sich pro- oder anti-inflammatorisch auf DCs auswirken. Auch eine Messung des intrazellulären S1P nach alleiniger TNF- α -Stimulation im Vergleich zur Ko-Stimulation mit anderen TLR-Liganden würde die fragliche S1P-Menge aufdecken können. Des Weiteren empfiehlt sich beispielsweise TRAF2 immunopräzipitieren und diese Präzipitate auf TRAF6 durch den Western Blot zu analysieren. Auf diese Weise erhält man Auskunft über eine mögliche Komplexbildung der beiden Signalmoleküle nach der Stimulation der Zellen mit TNF- α und LPS oder mit weiteren TLR-Liganden. Der etablierte Ubiquitin-Assay kann zudem auf weitere Untersuchungen der ubiquitinierten RIP1- und TRAF6-Moleküle angewandt werden. Da zu dem Zeitpunkt der Experimente keine SphK1-defizienten Weibchen zur Verfügung standen, wurden die Versuche mit SphK1-defizienten Zellen aus Männchen durchgeführt. Aus diesen konnte jedoch der IL-12p70-induzierende Effekt im Vergleich zum WT nicht bestätigt werden. Aus diesem Grund empfiehlt es sich die Experimente mit Zellen aus SphK1-defizienten Weibchen zu wiederholen. Zusätzlich, um Gewissheit darüber zu erlangen, ob die beiden Enzyme sich gegenseitig kompensieren, sollten SphK2^{-/-}-Zellen und DCs, welche mit siRNAs gegen beide Enzyme transfiziert wurden, hinzugezogen werden. Stellt sich dadurch heraus, dass das intrazelluläre S1P in pro-inflammatorischen Immunreaktionen beteiligt ist, können die Effekte weiterhin auf molekularer Ebene untersucht werden.

6.2 Austestung von S1P-neutralisierenden Spiegelmeren in KM-DCs

Um die Wirkung der spezifischen Spiegelmere bei der Aufhebung der IL-12p70 Hemmung weiter zu verfolgen, gibt es die Möglichkeit andere S1P_e-regulierte Zytokine, z. B. IL-6, nach einer TLR-Stimulation zu untersuchen. Des Weiteren ist es wichtig, eine konzentrationsabhängige Studie durchzuführen, in welcher, parallel zu eingesetzten Spiegelmeren, die dsRNA zum Ausschluss möglicher TLR3-Effekte eingesetzt wird. Um Gewissheit darüber zu erlangen, ob PEG die Bindung des Spiegelmers zum S1P verhindert, sollten Zellen mit PEG inkubiert und untersucht werden. Es ist auch möglich spezielle S1PR₁ Antagonisten, die vom Spiegelmer nicht gebunden werden können, als weitere Kontrollen einzusetzen. Weiterhin ist eine 30-minütige Vorinkubation des Spiegelmers (oder der Kontrolle) mit S1P in Verbindung mit einem Proteinträger (z. B. BSA) möglich, nach der die beiden Substanzen zusammen mit LPS zu den Zellen gegeben werden. Es sollten auch zellgängige und alternierende Derivate der Spiegelmere in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Zusätzlich könnte die mRNA der Zytokine gemessen werden, da diese möglicherweise sensitiver gegenüber den S1P-Effekten reagiert als das Protein. Wird die Spezifität und Intensität dieser S1P-neutralisierenden Spiegelmere sichergestellt, bietet sich die Möglichkeit intrazelluläre S1P-Effekte unabhängig von Rezeptorwirkungen des extrazellulären S1P in primären DCs zu untersuchen.

6.3 TLR-vermittelte Änderungen der S1P Enzym-Expression und die eingeleitete Reduktion des Überlebens der KM-DCs

Um in Erfahrung zu bringen, wie die Sphingolipid-Enzyme auf Protein-Ebene reguliert werden, sollten in weiterführenden Experimenten die Enzyme (SphK1, SphK2 und SPP1) sowohl durch Western Blot als auch durch Aktivitätsassay auf die Enzymaktivität hin gemessen werden. Dies würde unter anderem die Funktion der auf mRNA-Ebene heraufregulierten SphK1 nach einer LPS-Langzeitstimulation möglicherweise erklären. Weiterhin könnten Konzentrationen des extrazellulären S1P gemessen werden, auch wenn es sich bezüglich des gebundenen HDLs als schwierig erweisen könnte. Auch die ABC-Transporter sollten auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert und folglich ein

tatsächlicher S1P-Transport aus den Zellen festgestellt werden. Des Weiteren ist es notwendig die zur Apoptose führenden Doxorubicin-Effekte auf die LPS-stimulierten DCs zu übertragen. Hierzu empfiehlt es sich die Spaltung des Atg5, welches nach Doxorubicin-Gabe und SPP1-Reduktion auftritt, in den KM-DCs nach LPS-Aktivierung auf Protein-Ebene zu messen. Da das Interesse aber auf Untersuchungen der S1P Lyase-Regulation liegt, könnten weitere Analysen zur Aufdeckung intrazellulärer Regulationsmechanismen erfolgen. Beispielsweise wird die Transkription der S1P Lyase durch Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie, PDGF, mir125b und durch *cis*-Elemente mit frühem Wachstumsfaktor, Zink-Bindeprotein-Faktor sowie GC-Box-Faktor-Motiven reguliert.

Die Tamoxifen-Experimente sollten in Zukunft auf die *in vivo*-Applikation beschränkt werden. Die Untersuchungen könnten weitere Parameter einschließen, beispielsweise eine Analyse der DC-Oberflächenmarker und weiterer Organe auf die SPL mRNA-Menge. Da S1P einen wesentlichen Einfluss in Krebserkrankungen ausübt, kann man das System der Tamoxifen-induzierbaren SPL-Reduktion beispielsweise an einem DSS/AOM-Mausmodell des Darms austesten. Daraus könnten weitere Aspekte des intrazellulären S1P im Hinblick auf inflammatorische Eigenschaften der Krebs-Erkrankung erschlossen werden. Da Tamoxifen einen zusätzlichen anti-kanzerogenen Effekt aufweist, sollte dieser von dem durch S1P bzw. SPL-Reduktion verursachten wenn möglich auseinander gehalten werden.

7 Referenzen

- Aggarwal, B.B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (9), 745–756.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, Frederic J, Gurney, A.L., 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278 (3), 1910–1914.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, Willem, Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (3), 701–710.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4), 783–801.
- Aleman, R., van Koppen, Chris J, Danneberg, K., Ter Braak, M., Meyer Zu Heringdorf, Dagmar, 2007. Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 374 (5-6), 413–428.
- Aliberti, J., Sher, A., 2002. Positive and negative regulation of pathogen induced dendritic cell function by G-protein coupled receptors. *Mol. Immunol.* 38 (12-13), 891–893.
- Allende, M.L., Bektas, M., Lee, B.G., Bonifacio, E., Kang, J., Tuymetova, G., Chen, W., Saba, J.D., Proia, R.L., 2011. Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. *J. Biol. Chem.* 286 (9), 7348–7358.
- Alvarez, S.E., Harikumar, K.B., Hait, N.C., Allegood, J., Strub, G.M., Kim, E.Y., Maceyka, M., Jiang, H., Luo, C., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2010. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465 (7301), 1084–1088.
- An, S., Zheng, Y., Bleu, T., 2000. Sphingosine 1-Phosphate-induced Cell Proliferation, Survival, and Related Signaling Events Mediated by G Protein-coupled Receptors Edg3 and Edg5. *Journal of Biological Chemistry* 275 (1), 288–296.
- Ancellin, N., Colmont, C., Su, J., Li, Q., Mittereder, N., Chae, S.-S., Stefansson, S., Liao, G., Hla, T., 2002. Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J. Biol. Chem.* 277 (8), 6667–6675.
- Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemans, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., Molina, T., Charo, I., Hume, D.A., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F., 2009a. CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206 (3), 595–606.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009b. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692.
- Bacon, C.M., Petricoin, E.F., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., Larner, A.C., Johnston, J.A., O'Shea, J.J., 1995. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (16), 7307–7311.

- Bagdanoff, J.T., Donoviel, M.S., Nouraldeem, A., Tarver, J., Fu, Q., Carlsen, M., Jessop, T.C., Zhang, H., Hazelwood, J., Nguyen, H., Baugh, Simon D P, Gardyan, M., Terranova, K.M., Barbosa, J., Yan, J., Bednarz, M., Layek, S., Courtney, L.F., Taylor, J., Digeorge-Foushee, A.M., Gopinathan, S., Bruce, D., Smith, T., Moran, L., O'Neill, E., Kramer, J., Lai, Z., Kimball, S.D., Liu, Q., Sun, W., Yu, S., Swaffield, J., Wilson, A., Main, A., Carson, K.G., Oravec, T., Augeri, D.J., 2009. Inhibition of sphingosine-1-phosphate lyase for the treatment of autoimmune disorders. *J. Med. Chem.* 52 (13), 3941–3953.
- Bandhuvula, P., Saba, J.D., 2007. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med* 13 (5), 210–217.
- Bandhuvula, P., Tam, Y.Y., Oskouian, B., Saba, J.D., 2005. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J. Biol. Chem.* 280 (40), 33697–33700.
- Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P.R., Autenrieth, I., Neurath, M.F., 2003. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 112 (5), 693–706.
- Bektas, M., Allende, M.L., Lee, B.G., Chen, W., Amar, M.J., Remaley, A.T., Saba, J.D., Proia, R.L., 2010. Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J. Biol. Chem.* 285 (14), 10880–10889.
- Berdyshev, E.V., Gorshkova, I., Usatyuk, P., Kalari, S., Zhao, Y., Pyne, N.J., Pyne, S., Sabbadini, R.A., Garcia, Joe G N, Natarajan, V., 2011a. Intracellular S1P generation is essential for S1P-induced motility of human lung endothelial cells: role of sphingosine kinase 1 and S1P lyase. *PLoS ONE* 6 (1), e16571.
- Berdyshev, E.V., Goya, J., Gorshkova, I., Prestwich, G.D., Byun, H.-S., Bittman, R., Natarajan, V., 2011b. Characterization of sphingosine-1-phosphate lyase activity by electrospray ionization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantitation of (2E)-hexadecenal. *Anal. Biochem.* 408 (1), 12–18.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441 (7090), 235–238.
- Beutler, B., Jiang, Z., Georgel, P., Crozat, K., Croker, B., Rutschmann, S., Du, X., Hoebe, K., 2006. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 353–389.
- Billich, A., Baumruker, T., Beerli, C., Bigaud, M., Bruns, C., Calzascia, T., Isken, A., Kinzel, B., Loetscher, E., Metzler, B., Mueller, M., Nuesslein-Hildesheim, B., Kleylein-Sohn, B., 2013. Partial deficiency of sphingosine-1-phosphate lyase confers protection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE* 8 (3), e59630.
- Billich, A., Bornancin, F., Devay, P., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Baumruker, T., 2003. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem* 278 (48), 47408–47415.
- Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., Colonna, M., 2006. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J. Immunol.* 177 (5), 3260–3265.

- Breslow, D.K., Collins, S.R., Bodenmiller, B., Aebersold, R., Simons, K., Shevchenko, A., Ejning, C.S., Weissman, J.S., 2010. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* 463 (7284), 1048–1053.
- Brindley, D.N., Pilquill, C., 2009. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S225-30.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., Burtin, P., 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 9 (11), 883–897.
- Chang, H.C., Tsai, L.H., Chuang, L.Y., Hung, W.C., 2001. Role of AKT kinase in sphingosine-induced apoptosis in human hepatoma cells. *J Cell Physiol* 188 (2), 188–193.
- Chang, Z.L., 2010. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm. Res.* 59 (10), 791–808.
- Chang, Z.-Q., Lee, S.-Y., Kim, H.-J., Kim, J.R., Kim, S.-J., Hong, I.-K., Oh, B.-C., Choi, C.-S., Goldberg, I.J., Park, T.-S., 2011. Endotoxin activates de novo sphingolipid biosynthesis via nuclear factor kappa B-mediated upregulation of Sptlc2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 94 (1-2), 44–52.
- Chaturvedi, A., Pierce, S.K., 2009. How location governs toll-like receptor signaling. *Traffic* 10 (6), 621–628.
- Chen, H., Jiang, Z., 2013. The essential adaptors of innate immune signaling. *Protein Cell* 4 (1), 27–39.
- Chen, W.V., Delrow, J., Corrin, P.D., Frazier, J.P., Soriano, P., 2004. Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. *Nat Genet* 36 (3), 304–312.
- Chen, Y.-L., Chen, T.-T., Pai, L.-M., Wesoly, J., Bluysen, Hans A R, Lee, C.-K., 2013. A type I IFN-Flt3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* 210 (12), 2515–2522.
- Cheng, L.E., Chan, F.K., Cado, D., Winoto, A., 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* 16 (8), 1865–1875.
- Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., Green, D.R., 2012. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148 (5), 988–1000.
- Chun, J., Hla, T., Lynch, K.R., Spiegel, S., Moolenaar, W.H., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 62 (4), 579–587.
- Chung, J.Y., Park, Y.C., Ye, H., Wu, H., 2002. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell. Sci.* 115 (Pt 4), 679–688.
- Colié, S., Van Veldhoven, Paul P, Kedjouar, B., Bedia, C., Albinet, V., Sorli, S.-C., Garcia, V., Djavaheri-Mergny, M., Bauvy, C., Codogno, P., Levade, T., Andrieu-Abadie, N., 2009. Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. *Cancer Res.* 69 (24), 9346–9353.
- College of Engineering & Science-Louisiana Tech University, 2003. Lipids. www.chem.latech.edu, Louisiana.

- Colonna, M., Trinchieri, G., Liu, Y.-J., 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5 (12), 1219–1226.
- Conley, M.E., 2007. Immunodeficiency: UNC-93B gets a toll call. *Trends Immunol.* 28 (3), 99–101.
- Cresswell, P., 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259–293.
- Cuvillier, O., 2002. Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1585 (2–3), 153–162.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S., 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381 (6585), 800–803.
- Cyster, J.G., Schwab, S.R., 2012. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 69–94.
- D'Andrea, A., Ma, X., Aste-Amezaga, M., Paganin, C., Trinchieri, G., 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* 181 (2), 537–546.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Hedrick, S.M., Gerber, S.A., Lugovskoy, A., Yuan, J., 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.* 4 (5), 313–321.
- Dellacasagrande, J., 2009. Ligands, cell-based models, and readouts required for Toll-like receptor action. *Methods Mol. Biol.* 517, 15–32.
- Dinarello, C.A., 2007. Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1, S34–45.
- Do, R.K., 2000. Attenuation of Apoptosis Underlies B Lymphocyte Stimulator Enhancement of Humoral Immune Response. *Journal of Experimental Medicine* 192 (7), 953–964.
- DOLE, V.P., MEINERTZ, H., 1960. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235, 2595–2599.
- Engel, N., Lisec, J., Piechulla, B., Nebe, B., 2012. Metabolic profiling reveals sphingosine-1-phosphate kinase 2 and lyase as key targets of (phyto-) estrogen action in the breast cancer cell line MCF-7 and not in MCF-12A. *PLoS ONE* 7 (10), e47833.
- Esendagli, G., Kurne, A.T., Sayat, G., Kilic, A.K., Guc, D., Karabudak, R., 2013. Evaluation of Th17-related cytokines and receptors in multiple sclerosis patients under interferon β -1 therapy. *J. Neuroimmunol.* 255 (1–2), 81–84.
- Ewald, S.E., Lee, B.L., Lau, L., Wickliffe, K.E., Shi, G.-P., Chapman, H.A., Barton, G.M., 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456 (7222), 658–662.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, Christian R H, Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, Michael J O, Dennis, E.A., 2009. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S9–14.
- Fawzy, I.O., Negm, M., Ahmed, R., Esmat, G., Hamdi, N., Abdelaziz, A.I., 2014. Tamoxifen downregulates MxA expression by suppressing TLR7 expression in PBMCs of males infected with HCV. *J. Med. Virol.* 86 (7), 1113–1119.

- Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S., Vandenabeele, P., 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ.* 14 (3), 400–410.
- Franchi, L., Malisan, F., Tomassini, B., Testi, R., 2006. Ceramide catabolism critically controls survival of human dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 79 (1), 166–172.
- Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., Ichijo, H., 2007. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol. Cell. Biol.* 27 (23), 8152–8163.
- Fukao, T., Frucht, D.M., Yap, G., Gadina, M., O'Shea, J.J., Koyasu, S., 2001. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 166 (7), 4446–4455.
- Fukuhara, S., Simmons, S., Kawamura, S., Inoue, A., Orba, Y., Tokudome, T., Sunden, Y., Arai, Y., Moriwaki, K., Ishida, J., Uemura, A., Kiyonari, H., Abe, T., Fukamizu, A., Hirashima, M., Sawa, H., Aoki, J., Ishii, M., Mochizuki, N., 2012. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.* 122 (4), 1416–1426.
- Furst, D.E., Emery, P., 2014. Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets. *Rheumatology (Oxford)*.
- Gangloff, M., 2012. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends Biochem. Sci.* 37 (3), 92–98.
- Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., Presky, D.H., 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 495–521.
- Gentile, I.E., Wong, W.W.-L., Evans, J.M., Bankovacki, A., Cook, W.D., Khan, N.R., Nachbur, U., Rickard, J., Anderton, H., Moulin, M., Lluís, J.M., Moujalled, D.M., Silke, J., Vaux, D.L., 2011. In TNF-stimulated cells, RIPK1 promotes cell survival by stabilizing TRAF2 and cIAP1, which limits induction of non-canonical NF-kappaB and activation of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 286 (15), 13282–13291.
- Ghosh, T.K., Bian, J., Gill, D.L., 1994. Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem* 269 (36), 22628–22635.
- Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F.J., Stremlo, D.L., Familletti, P.C., Gubler, U., Presky, D.H., Stern, A.S., Gately, M.K., 1995. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur. J. Immunol.* 25 (1), 200–206.
- Goetzl, E.J., Liao, J.-J., Huang, M.-C., 2008. Regulation of the roles of sphingosine 1-phosphate and its type 1 G protein-coupled receptor in T cell immunity and autoimmunity. *Biochim Biophys Acta* 1781 (9), 503–507.
- Goetzl, E.J., Wang, W., McGiffert, C., Huang, M.-C., Graler, M.H., 2004. Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J Cell Biochem* 92 (6), 1104–1114.
- Granucci, F., Zanoni, I., 2009. The dendritic cell life cycle. *Cell Cycle* 8 (23), 3816–3821.
- Gubler, U., Chua, A.O., Schoenhaut, D.S., Dwyer, C.M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Familletti, P.C., 1991. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (10), 4143–4147.

- Gurgui, M., Broere, R., Kalff, J.C., van Echten-Deckert, G., 2010. Dual action of sphingosine 1-phosphate in eliciting proinflammatory responses in primary cultured rat intestinal smooth muscle cells. *Cell. Signal.* 22 (11), 1727–1733.
- Hagen, N., Van Veldhoven, P., Proia, R.L., Park, H., Merrill, A.H., van Echten-Deckert, G., 2009. Subcellular origin of sphingosine 1-phosphate is essential for its toxic effect in lyase-deficient neurons. *J. Biol. Chem.* 284 (17), 11346–11353.
- Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2009. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325 (5945), 1254–1257.
- Hannun, Y.A., Luberto, C., 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 10 (2), 73–80.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2), 139–150.
- Harikumar, K.B., Yester, J.W., Surace, M.J., Oyeniran, C., Price, M.M., Huang, W.-C., Hait, N.C., Allegood, J.C., Yamada, A., Kong, X., Lazear, H.M., Bhardwaj, R., Takabe, K., Diamond, M.S., Luo, C., Milstien, S., Spiegel, S., Kordula, T., 2014. K63-linked polyubiquitination of transcription factor IRF1 is essential for IL-1-induced production of chemokines CXCL10 and CCL5. *Nat. Immunol.* 15 (3), 231–238.
- Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K.H., Kishimoto, T., 1985. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (16), 5490–5494.
- Hisano, Y., Kobayashi, N., Yamaguchi, A., Nishi, T., 2012. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS ONE* 7 (6), e38941.
- Hla, T., Galvani, S., Rafii, S., Nachman, R., 2012. S1P and the birth of platelets. *J. Exp. Med.* 209 (12), 2137–2140.
- Hla, T., Venkataraman, K., Michaud, J., 2008. The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (9), 477–482.
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., Luft, T., Vandenabeele, S., Grumont, R.J., Maraskovsky, E., Shortman, K., 2000. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192 (6), 823–833.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J., 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1 (6), 489–495.
- Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T., Kishimoto, T., 1992. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J. Immunol.* 148 (7), 2175–2180.
- Honig, S.M., Fu, S., Mao, X., Yopp, A., Gunn, M.D., Randolph, G.J., Bromberg, J.S., 2003. FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J. Clin. Invest.* 111 (5), 627–637.
- Hopson, K.P., Truelove, J., Chun, J., Wang, Y., Waeber, C., 2011. S1P activates store-operated calcium entry via receptor- and non-receptor-mediated pathways in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 300 (4), C919–26.

- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G., 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168 (9), 4531–4537.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M., 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260 (5107), 547–549.
- Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., Jones, S.A., 2001. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14 (6), 705–714.
- Husebye, H., Halaas, Ø., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, Ø., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., Espevik, T., 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 25 (4), 683–692.
- Hutton, J.J., Jegga, A.G., Kong, S., Gupta, A., Ebert, C., Williams, S., Katz, J.D., Aronow, B.J., 2004. Microarray and comparative genomics-based identification of genes and gene regulatory regions of the mouse immune system. *BMC Genomics* 5, 82.
- Ihlefeld, K., Claas, R.F., Koch, A., Pfeilschifter, J.M., Meyer Zu Heringdorf, Dagmar, 2012. Evidence for a link between histone deacetylation and Ca²⁺ homeostasis in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. *Biochem. J.* 447 (3), 457–464.
- Ikeda, M., Kihara, A., Igarashi, Y., 2004a. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (1), 338–343.
- Ikeda, M., Kihara, A., Igarashi, Y., 2004b. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 325 (1), 338–343.
- Itagaki, K., Yun, J.K., Hengst, J.A., Yatani, A., Hauser, C.J., Spolarics, Z., Deitch, E.A., 2007. Sphingosine 1-phosphate has dual functions in the regulation of endothelial cell permeability and Ca²⁺ metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323 (1), 186–191.
- Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Ikeda, M., Sano, T., Kihara, A., Igarashi, Y., 2007. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 (1), 212–217.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5 (10), 987–995.
- Jägle, U., Gasser, J.A., Müller, M., Kinzel, B., 2007. Conditional transgene expression mediated by the mouse beta-actin locus. *Genesis* 45 (11), 659–666.
- Janeway, C., 2001. *Immunobiology 5. The immune system in health and disease*, 5th ed. Garland Pub., New York, xviii, 732.
- Janeway, Charles A Jr, Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197–216.
- Jones, S.A., Fraser, D.J., Fielding, C.A., Jones, G.W., 2014. Interleukin-6 in renal disease and therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.*

- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., Liu, Y.J., 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194 (6), 863–869.
- Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., Medzhitov, R., 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* 9 (4), 361–368.
- Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., Shortman, K., 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100 (5), 1734–1741.
- Kamphorst, A.O., Guernonprez, P., Dudziak, D., Nussenzweig, M.C., 2010. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J. Immunol.* 185 (6), 3426–3435.
- Kara, E.E., Comerford, I., Fenix, K.A., Bastow, C.R., Gregor, C.E., McKenzie, D.R., McColl, S.R., 2014. Tailored immune responses: novel effector helper T cell subsets in protective immunity. *PLoS Pathog.* 10 (2), e1003905.
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11 (5), 373–384.
- Kingston, D., Schmid, M.A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., Manz, M.G., 2009. The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* 114 (4), 835–843.
- Kleinjan, A., van Nimwegen, M., Leman, K., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N., 2013. Topical treatment targeting sphingosine-1-phosphate and sphingosine lyase abrogates experimental allergic rhinitis in a murine model. *Allergy* 68 (2), 204–212.
- Kluk, M.J., Hla, T., 2001. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ. Res.* 89 (6), 496–502.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G., 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170 (3), 827–845.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kämpgen, E., Romani, N., Schuler, G., 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184 (2), 741–746.
- Kohno, M., Momoi, M., Oo, M.L., Paik, J.-H., Lee, Y.-M., Venkataraman, K., Ai, Y., Ristimäki, A.P., Fyrist, H., Sano, H., Rosenberg, D., Saba, J.D., Proia, R.L., Hla, T., 2006. Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol* 26 (19), 7211–7223.
- Krishnaswamy, J.K., Chu, T., Eisenbarth, S.C., 2013. Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. *Trends Immunol.* 34 (5), 224–233.
- Kumar, A., Saba, J.D., 2009. Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* 13 (8), 1013–1025.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388 (4), 621–625.
- Kurano, M., Hara, M., Tsuneyama, K., Sakoda, H., Shimizu, T., Tsukamoto, K., Ikeda, H., Yatomi, Y., 2014. Induction of insulin secretion by apolipoprotein M, a carrier for sphingosine 1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (9), 1217–1226.

- Lai, W.-Q., Irwan, A.W., Goh, H.H., Melendez, A.J., McInnes, I.B., Leung, B.P., 2009. Distinct roles of sphingosine kinase 1 and 2 in murine collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 183 (3), 2097–2103.
- Lai, W.-Q., Melendez, A.J., Leung, B.P., 2010. Role of sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in inflammatory arthritis. *World J Biol Chem* 1 (11), 321–326.
- LaMontagne, K., Littlewood-Evans, A., Schnell, C., O'Reilly, T., Wyder, L., Sanchez, T., Probst, B., Butler, J., Wood, A., Liao, G., Billy, E., Theuer, A., Hla, T., Wood, J., 2006. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res.* 66 (1), 221–231.
- Lawless, V.A., Zhang, S., Ozes, O.N., Bruns, H.A., Oldham, I., Hoey, T., Grusby, M.J., Kaplan, M.H., 2000. Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma-inducing signaling pathways. *J. Immunol.* 165 (12), 6803–6808.
- Le Huu, D., Matsushita, T., Jin, G., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., Fujimoto, M., 2013. FTY720 ameliorates murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease by promoting expansion of splenic regulatory cells and inhibiting immune cell infiltration into skin. *Arthritis Rheum.* 65 (6), 1624–1635.
- Le Stunff, H., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J. Cell Biol.* 158 (6), 1039–1049.
- Ledermann, B., Bürki, K., 1991. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp. Cell Res.* 197 (2), 254–258.
- Lee, H., Park, H.S., Hong, S.H., Choi, O.K., Cho, S.-D., Park, J., Oh, J.E., Chung, S.S., Jung, H.S., Park, K.S., 2013. 4-Deoxypyridoxine improves the viability of isolated pancreatic islets ex vivo. *Islets* 5 (3), 116–121.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A., 2012. Pillars article: the dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996. 86: 973-983. *J. Immunol.* 188 (11), 5210–5220.
- Lepeniev, B., Lee, J., Sonkaria, S., 2013. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (9), 1271–1281.
- Lépine, S., Allegood, J.C., Edmonds, Y., Milstien, S., Spiegel, S., 2011a. Autophagy induced by deficiency of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 is switched to apoptosis by calpain-mediated autophagy-related gene 5 (Atg5) cleavage. *J. Biol. Chem.* 286 (52), 44380–44390.
- Lépine, S., Allegood, J.C., Park, M., Dent, P., Milstien, S., Spiegel, S., 2011b. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell Death Differ.* 18 (2), 350–361.
- Liang, J., Nagahashi, M., Kim, E.Y., Harikumar, K.B., Yamada, A., Huang, W.-C., Hait, N.C., Allegood, J.C., Price, M.M., Avni, D., Takabe, K., Kordula, T., Milstien, S., Spiegel, S., 2013. Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 23 (1), 107–120.
- Limaye, V., Li, X., Hahn, C., Xia, P., Berndt, M.C., Vadas, M.A., Gamble, J.R., 2005. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood* 105 (8), 3169–3177.

- Lin, Y.-F., Leu, S.-J., Huang, H.-M., Tsai, Y.-H., 2011. Selective activation of specific PKC isoforms dictating the fate of CD14(+) monocytes towards differentiation or apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 226 (1), 122–131.
- Liu, H., Toman, R.E., Goparaju, S.K., Maceyka, M., Nava, V.E., Sankala, H., Payne, S.G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S., 2003. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278 (41), 40330–40336.
- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., Nussenzweig, M., 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* 8 (6), 578–583.
- Liu, M., Seo, J., Allegood, J., Bi, X., Zhu, X., Boudyguina, E., Gebre, A.K., Avni, D., Shah, D., Sorci-Thomas, M.G., Thomas, M.J., Shelness, G.S., Spiegel, S., Parks, J.S., 2014. Hepatic apolipoprotein M (apoM) overexpression stimulates formation of larger apoM/sphingosine 1-phosphate-enriched plasma high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 289 (5), 2801–2814.
- Liu, X., Xiong, S.L., Yi, G.-H., 2012. ABCA1, ABCG1, and SR-BI: Transit of HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Clin. Chim. Acta* 413 (3-4), 384–390.
- Liu, Y.-J., 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275–306.
- Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Rospigliosi, C.C., Conze, D.B., Wu, C.-J., Ashwell, J.D., Eliezer, D., Wu, H., 2009. Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO. *Mol. Cell* 33 (5), 602–615.
- Loo, Y.-M., Gale, M., 2011. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34 (5), 680–692.
- Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., Tschopp, J., 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370 (6491), 650–652.
- Lüth, A., Neuber, C., Kleuser, B., 2012. Novel methods for the quantification of (2E)-hexadecenal by liquid chromatography with detection by either ESI QTOF tandem mass spectrometry or fluorescence measurement. *Anal. Chim. Acta* 722, 70–79.
- Ma, H.-L., Napierata, L., Stedman, N., Benoit, S., Collins, M., Nickerson-Nutter, C., Young, D.A., 2010. Tumor necrosis factor alpha blockade exacerbates murine psoriasis-like disease by enhancing Th17 function and decreasing expansion of Treg cells. *Arthritis Rheum.* 62 (2), 430–440.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., Spiegel, S., 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 22 (1), 50–60.
- Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585 (2-3), 193–201.
- Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H., Milstien, S., Spiegel, S., 2005. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 280 (44), 37118–37129.
- Maceyka, M., Spiegel, S., 2014. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510 (7503), 58–67.
- Madeddu, C., Gramignano, G., Kotsonis, P., Paribello, F., Maccio, A., 2014. Ovarian hyperstimulation in premenopausal women during adjuvant tamoxifen treatment for endocrine-dependent breast cancer: A report of two cases. *Oncol Lett* 8 (3), 1279–1282.

- Maeda, Y., Matsuyuki, H., Shimano, K., Kataoka, H., Sugahara, K., Chiba, K., 2007. Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3. *J Immunol* 178 (6), 3437–3446.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., Weaver, C.T., 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441 (7090), 231–234.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., Smedt, T. de, Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E.R., Teepe, M., Lyman, S.D., Peschon, J.J., 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95 (11), 3489–3497.
- Mechtcheriakova, D., Wlachos, A., Sobanov, J., Kopp, T., Reuschel, R., Bornancin, F., Cai, R., Zemmann, B., Urtz, N., Stingl, G., Zlabinger, G., Woisetschlager, M., Baumruker, T., Billich, A., 2007. Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses. *Cell. Signal.* 19 (4), 748–760.
- Medzhitov, R., Janeway, C., JR, 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89–97.
- Melendez, A.J., 2008. Allergy therapy: the therapeutic potential of targeting sphingosine kinase signalling in mast cells. *Eur. J. Immunol.* 38 (11), 2969–2974.
- Mellman, I., Steinman, R.M., 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106 (3), 255–258.
- Merrill, A.H., Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., Wang, E., 1997. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142 (1), 208–225.
- Meyer Zu Heringdorf, Dagmar, Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J.H., Tigyi, G., Jakobs, K.H., 2003. Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 554 (3), 443–449.
- Meyer zu Heringdorf, D., van Koppen, C J, Windorfer, B., Himmel, H.M., Jakobs, K.H., 1996. Calcium signalling by G protein-coupled sphingolipid receptors in bovine aortic endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 354 (4), 397–403.
- Mifsud, E.J., Tan, Amabel C L, Jackson, D.C., 2014. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol* 5, 79.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M., 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* 164 (12), 6166–6173.
- Morad, Samy A F, Levin, J.C., Tan, S.-F., Fox, T.E., Feith, D.J., Cabot, M.C., 2013. Novel off-target effect of tamoxifen--inhibition of acid ceramidase activity in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (12), 1657–1664.
- Müller, H., Hofer, S., Kaneider, N., Neuwirt, H., Mosheimer, B., Mayer, G., Konwalinka, G., Heufler, C., Tiefenthaler, M., 2005. The immunomodulator FTY720 interferes with effector functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 35 (2), 533–545.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., Janeway, C., 2008. Janeway's immunobiology, 7th ed. Garland Science, New York, xxi, 887.

- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., Shortman, K., 2006. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7 (6), 663–671.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., Kwak, J.-Y., Wu, L., Shortman, K., 2007. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8 (11), 1217–1226.
- Nishi, T., Kobayashi, N., Hisano, Y., Kawahara, A., Yamaguchi, A., 2014. Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (5), 759–765.
- Ofengeim, D., Yuan, J., 2013. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (11), 727–736.
- Ogolla, P.S., Portillo, J.-A.C., White, C.L., Patel, K., Lamb, B., Sen, G.C., Subauste, C.S., 2013. The protein kinase double-stranded RNA-dependent (PKR) enhances protection against disease cause by a non-viral pathogen. *PLoS Pathog.* 9 (8), e1003557.
- Ohta, H., Yatomi, Y., Sweeney, E.A., Hakomori, S., Igarashi, Y., 1994. A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils. *FEBS Lett* 355 (3), 267–270.
- Olivera, A., Rosenfeldt, H.M., Bektas, M., Wang, F., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S., 2003. Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 278 (47), 46452–46460.
- Olivera, A., Spiegel, S., 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365 (6446), 557–560.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., Manz, M.G., 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8 (11), 1207–1216.
- O'Neill, Luke A J, Fitzgerald, K.A., Bowie, A.G., 2003. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol.* 24 (6), 286–290.
- O'Neill, Luke A J, Golenbock, D., Bowie, A.G., 2013. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13 (6), 453–460.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., Waal-Malefyt, R. de, Hannum, C., Bazan, J.F., Kastelein, R.A., 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13 (5), 715–725.
- Oskeritzian, C.A., Alvarez, S.E., Hait, N.C., Price, M.M., Milstien, S., Spiegel, S., 2008. Distinct roles of sphingosine kinases 1 and 2 in human mast-cell functions. *Blood* 111 (8), 4193–4200.
- Oskouian, B., Mendel, J., Shocron, E., Lee, Michael A Jr, Fyrst, H., Saba, J.D., 2005. Regulation of sphingosine-1-phosphate lyase gene expression by members of the GATA family of transcription factors. *J Biol Chem* 280 (18), 18403–18410.
- Ospelt, C., Gay, S., 2010. TLRs and chronic inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (4), 495–505.

- O'Sullivan, C., Dev, K.K., 2013. The structure and function of the S1P1 receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (7), 401–412.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A.-M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D.M., Kastelein, R.A., de Waal Malefyt, R., Moore, K.W., 2002. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* 168 (11), 5699–5708.
- Park, B.S., Lee, J.-O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* 45, e66.
- Park, Y.-H., Jeong, M.S., Park, H.H., Jang, S.B., 2013. Formation of the death domain complex between FADD and RIP1 proteins in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1834 (1), 292–300.
- Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 531 (1), 54–57.
- Pène, F., Courtine, E., Ouaz, F., Zuber, B., Sauneuf, B., Sirgo, G., Rousseau, C., Toubiana, J., Balloy, V., Chignard, M., Mira, J.-P., Chiche, J.-D., 2009. Toll-like receptors 2 and 4 contribute to sepsis-induced depletion of spleen dendritic cells. *Infect. Immun.* 77 (12), 5651–5658.
- Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., Kedl, R.M., 2013. T cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ* 37 (4), 273–283.
- Pitson, S.M., Xia, P., Leclercq, T.M., Moretti, P.A.B., Zebol, J.R., Lynn, H.E., Wattenberg, B.W., Vadas, M.A., 2005. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J. Exp. Med.* 201 (1), 49–54.
- Platt, A.M., Randolph, G.J., 2013. Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes. *Adv. Immunol.* 120, 51–68.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282 (5396), 2085–2088.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., Shortman, K., 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 166 (9), 5327–5330.
- Pritchard, A.J., Mir, A.K., Dev, K.K., 2014. Fingolimod attenuates splenocyte-induced demyelination in cerebellar slice cultures. *PLoS ONE* 9 (6), e99444.
- Proell, M., Riedl, S.J., Fritz, J.H., Rojas, A.M., Schwarzenbacher, R., 2008. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS ONE* 3 (4), e2119.
- Purschke, W.G., Hoehlig, K., Buchner, K., Zboralski, D., Schwoebel, F., Vater, A., Klussmann, S., 2014. Identification and characterization of a mirror-image oligonucleotide that binds and neutralizes sphingosine 1-phosphate, a central mediator of angiogenesis. *Biochem. J.* 462 (1), 153–162.
- Pushparaj, P.N., Manikandan, J., Tay, H.K., H'ng, S.C., Kumar, S.D., Pfeilschifter, J., Huwiler, A., Melendez, A.J., 2009. Sphingosine kinase 1 is pivotal for Fc epsilon RI-mediated mast cell signaling and functional responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 183 (1), 221–227.

- Reis e Sousa, Caetano, 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* 16 (1), 27–34.
- Reizis, B., Colonna, M., Trinchieri, G., Barrat, F., Gillet, M., 2011. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nat. Rev. Immunol.* 11 (8), 558–565.
- Romani, N., Koide, S., Crowley, M., Witmer-Pack, M., Livingstone, A.M., Fathman, C.G., Inaba, K., Steinman, R.M., 1989. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169 (3), 1169–1178.
- Rosen, H., Goetzl, E.J., 2005. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat. Rev. Immunol.* 5 (7), 560–570.
- Saba, J.D., de la Garza-Rodea, Anabel S, 2013. S1P lyase in skeletal muscle regeneration and satellite cell activation: exposing the hidden lyase. *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (1), 167–175.
- Sasai, M., Tatematsu, M., Oshiumi, H., Funami, K., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Seya, T., 2010. Direct binding of TRAF2 and TRAF6 to TICAM-1/TRIF adaptor participates in activation of the Toll-like receptor 3/4 pathway. *Mol. Immunol.* 47 (6), 1283–1291.
- Sathe, P., Vremec, D., Wu, L., Corcoran, L., Shortman, K., 2013. Convergent differentiation: myeloid and lymphoid pathways to murine plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 121 (1), 11–19.
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., Murphy, K.M., 2012. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13 (12), 1145–1154.
- Schaper, K., Kietzmann, M., Bäumer, W., 2014. Sphingosine-1-phosphate differently regulates the cytokine production of IL-12, IL-23 and IL-27 in activated murine bone marrow derived dendritic cells. *Mol. Immunol.* 59 (1), 10–18.
- Schlitzer, A., Loschko, J., Mair, K., Vogelmann, R., Henkel, L., Einwächter, H., Schiemann, M., Niess, J.-H., Reindl, W., Krug, A., 2011. Identification of CCR9-murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs. *Blood* 117 (24), 6562–6570.
- Schmahl, J., Raymond, C.S., Soriano, P., 2007. PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat Genet* 39 (1), 52–60.
- Schmid, M.A., Kingston, D., Boddupalli, S., Manz, M.G., 2010. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol. Rev.* 234 (1), 32–44.
- Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Wagner, M., Cebon, J., Maraskovsky, E., 2005. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 105 (4), 1582–1589.
- Schröder, M., Arlt, O., Schmidt, H., Huwiler, A., Angioni, C., Pfeilschifter, J.M., Schwiebs, A., Radeke, H.H., 2015. Subcellular distribution of FTY720 and FTY720-phosphate in immune cells - another aspect of Fingolimod action relevant for therapeutic application. *Biological chemistry*.
- Schröder, M., Richter, C., Juan, Martina Herrero San, Maltusch, K., Giegold, O., Quintini, G., Pfeilschifter, J.M., Huwiler, A., Radeke, H.H., 2011. The sphingosine kinase 1 and S1P1 axis specifically counteracts LPS-induced IL-12p70 production in immune cells of the spleen. *Mol. Immunol.* 48 (9-10), 1139–1148.

- Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., Cyster, J.G., 2005. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309 (5741), 1735–1739.
- Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K., 1995. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* 23 (24), 5080–5081.
- Sensken, S.-C., Bode, C., Gräler, M.H., 2009. Accumulation of fingolimod (FTY720) in lymphoid tissues contributes to prolonged efficacy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328 (3), 963–969.
- Seo, Y.-J., Blake, C., Alexander, S., Hahm, B., 2010. Sphingosine 1-phosphate-metabolizing enzymes control influenza virus propagation and viral cytopathogenicity. *J. Virol.* 84 (16), 8124–8131.
- Séré, K.M., Lin, Q., Felker, P., Rehage, N., Klisch, T., Ortseifer, I., Hieronymus, T., Rose-John, S., Zenke, M., 2012. Dendritic cell lineage commitment is instructed by distinct cytokine signals. *Eur. J. Cell Biol.* 91 (6-7), 515–523.
- Shi, X.-B., Xue, L., Yang, J., Ma, A.-H., Zhao, J., Xu, M., Tepper, C.G., Evans, C.P., Kung, H.-J., deVere White, Ralph W., 2007. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (50), 19983–19988.
- Shortman, K., Heath, W.R., 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234 (1), 18–31.
- Shortman, K., Naik, S.H., 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (1), 19–30.
- Snider, A.J., 2013. Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate: regulators in autoimmune and inflammatory disease. *Int J Clin Rheumtol* 8 (4).
- Snijders, A., Hilkens, C.M., van der Pouw Kraan, T C, Engel, M., Aarden, L.A., Kapsenberg, M.L., 1996. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J. Immunol.* 156 (3), 1207–1212.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2007. Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J. Biol. Chem.* 282 (4), 2125–2129.
- Spiegel, S., Milstien, S., 2011. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11 (6), 403–415.
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137 (5), 1142–1162.
- Steinman, R.M., Witmer, M.D., 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (10), 5132–5136.
- Tabasinezhad, M., Samadi, N., Ghanbari, P., Mohseni, M., Saei, A.A., Sharifi, S., Saeedi, N., Pourhassan, A., 2013. Sphingosin 1-phosphate contributes in tumor progression. *J Cancer Res Ther* 9 (4), 556–563.
- Takasugi, N., Sasaki, T., Suzuki, K., Osawa, S., Isshiki, H., Hori, Y., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Tomita, T., Iwatsubo, T., 2011. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J. Neurosci.* 31 (18), 6850–6857.
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16 (1), 3–9.

- Takeshita, H., Kitano, M., Iwasaki, T., Kitano, S., Tsunemi, S., Sato, C., Sekiguchi, M., Azuma, N., Miyazawa, K., Hla, T., Sano, H., 2012. Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor 1 signaling regulates receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) expression in rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419 (2), 154–159.
- Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 (1), 94–99.
- Teijeira, A., Russo, E., Halin, C., 2014. Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes. *Semin Immunopathol* 36 (2), 261–274.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., Weissman, I.L., 2000. Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290 (5499), 2152–2154.
- Trez, C. de, Pajak, B., Brait, M., Glaichenhaus, N., Urbain, J., Moser, M., Lauvau, G., Muraille, E., 2005. TLR4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN- β , but not MyD88, regulate *Escherichia coli*-induced dendritic cell maturation and apoptosis in vivo. *J. Immunol.* 175 (2), 839–846.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., Kastelein, R.A., 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19 (5), 641–644.
- Tuskey, A., Behm, B.W., 2014. Profile of ustekinumab and its potential in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Clin Exp Gastroenterol* 7, 173–179.
- Usatyuk, P.V., He, D., Bindokas, V., Gorshkova, I.A., Berdyshev, E.V., Garcia, Joe G N, Natarajan, V., 2011. Photolysis of caged sphingosine-1-phosphate induces barrier enhancement and intracellular activation of lung endothelial cell signaling pathways. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 300 (6), L840–50.
- Van Brocklyn, J R, Lee, M.J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D.M., Coopman, P.J., Thangada, S., Liu, C.H., Hla, T., Spiegel, S., 1998. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell Biol.* 142 (1), 229–240.
- Van Brocklyn, James R, Jackson, C.A., Pearl, D.K., Kotur, M.S., Snyder, P.J., Prior, T.W., 2005. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (8), 695–705.
- van de Ven, Rieneke, de Jong, Mariska C, Reurs, A.W., Schoonderwoerd, Antoinet J N, Jansen, G., Hooijberg, J.H., Scheffer, G.L., de Gruijl, Tanja D, Scheper, R.J., 2006. Dendritic cells require multidrug resistance protein 1 (ABCC1) transporter activity for differentiation. *J. Immunol.* 176 (9), 5191–5198.
- Van Veldhoven, P P, 2000. Sphingosine-1-phosphate lyase. *Meth. Enzymol.* 311, 244–254.
- Van Veldhoven, P P, Gijsbers, S., Mannaerts, G.P., Vermeesch, J.R., Brys, V., 2000. Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochim Biophys Acta* 1487 (2-3), 128–134.
- Verma, R., Verma, N., Paul, J., 2013. Expression of inflammatory genes in the colon of ulcerative colitis patients varies with activity both at the mRNA and protein level. *Eur. Cytokine Netw.* 24 (3), 130–138.

- Vessey, D.A., Li, L., Imhof, I., Honbo, N., Karliner, J.S., 2013. FTY720 postconditions isolated perfused heart by a mechanism independent of sphingosine kinase 2 and different from S1P or ischemic postconditioning. *Med Sci Monit Basic Res* 19, 126–132.
- Vogel, P., Donoviel, M.S., Read, R., Hansen, G.M., Hazlewood, J., Anderson, S.J., Sun, W., Swaffield, J., Oravec, T., 2009. Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS ONE* 4 (1), e4112.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., Shortman, K., 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176 (1), 47–58.
- Wadgaonkar, R., Patel, V., Grinkina, N., Romano, C., Liu, J., Zhao, Y., Sammani, S., Garcia, Joe G N, Natarajan, V., 2009. Differential regulation of sphingosine kinases 1 and 2 in lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 296 (4), L603-13.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., Riddell, S.R., 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333 (16), 1038–1044.
- Wang, T., Jiang, Q., Chan, C., Gorski, K.S., McCadden, E., Kardian, D., Pardoll, D., Whartenby, K.A., 2009. Inhibition of activation-induced death of dendritic cells and enhancement of vaccine efficacy via blockade of MINOR. *Blood* 113 (13), 2906–2913.
- Weber, C., Krueger, A., Münk, A., Bode, C., Van Veldhoven, Paul P, Gräler, M.H., 2009. Discontinued postnatal thymocyte development in sphingosine 1-phosphate-lyase-deficient mice. *J. Immunol.* 183 (7), 4292–4301.
- Wu, C., Wang, X., Gadina, M., O'Shea, J.J., Presky, D.H., Magram, J., 2000. IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J. Immunol.* 165 (11), 6221–6228.
- Xiong, Y., Hla, T., 2014. S1P control of endothelial integrity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 378, 85–105.
- Yatomi, Y., 2008. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (3), 606–611.
- Ye, H., Arron, J.R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N.K., Segal, D., Dzivenu, O.K., Vologodskaya, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J.W., Darnay, B.G., Choi, Y., Wu, H., 2002. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418 (6896), 443–447.
- Zanoni, I., Ostuni, R., Capuano, G., Collini, M., Caccia, M., Ronchi, A.E., Rocchetti, M., Mingozzi, F., Foti, M., Chirico, G., Costa, B., Zaza, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Granucci, F., 2009. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* 460 (7252), 264–268.
- Zhan, X., Desiderio, D.M., 2006. Nitroproteins from a human pituitary adenoma tissue discovered with a nitrotyrosine affinity column and tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 354 (2), 279–289.

- Zhang, J., Zhao, J., Jiang, W.-j., Shan, X.-w., Yang, X.-m., Gao, J.-g., 2012. Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era. *J Zhejiang Univ Sci B* 13 (7), 511–524.
- Zhao, Y., Gorshkova, I.A., Berdyshev, E., He, D., Fu, P., Ma, W., Su, Y., Usatyuk, P.V., Pendyala, S., Oskouian, B., Saba, J.D., Garcia, Joe G N, Natarajan, V., 2011. Protection of LPS-induced murine acute lung injury by sphingosine-1-phosphate lyase suppression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45 (2), 426–435.
- Zou, X., Xu, J., Yao, S., Li, J., Yang, Y., Le Yang, 2014. ER stress-mediated autophagy protects against LPS-induced apoptosis in HL-1 cardiomyocytes. *Exp. Physiol.*

8 Appendix

8.1 Abkürzungsverzeichnis

<i>AICD</i>	<i>Activation-induced cell death</i>
<i>APC</i>	<i>Antigen presenting cell</i>
<i>Apo M</i>	<i>Apolipoprotein M</i>
<i>APS</i>	<i>Ammonium Peroxid Sulfat</i>
<i>AP-1</i>	<i>activator protein 1</i>
<i>BACE1-Enzym</i>	<i>β-site APP cleaving enzyme-1</i>
<i>BCA</i>	<i>Bicinchoninic Acid</i>
<i>bp</i>	<i>Basenpaar</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovine serum albumin</i>
<i>CCR</i>	<i>C-C chemokine receptor</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<i>Cdase</i>	<i>Ceramidase</i>
<i>cDC</i>	<i>Conventional DC</i>
<i>cDNA</i>	<i>CopyDNA</i>
<i>CDP</i>	<i>Common CD progenitor</i>
<i>Cer</i>	<i>Ceramid</i>
<i>CerS</i>	<i>Ceramid Synthase</i>
<i>CerK</i>	<i>Ceramidkinase</i>
<i>cFLIP_L</i>	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
<i>ciAP</i>	<i>Cellular inhibitors of apoptosis</i>
<i>CLR</i>	<i>C-type lectin receptors</i>
<i>CMP</i>	<i>Common myeloid precursor</i>
<i>CTL</i>	<i>Zytotoxische T-Zelle</i>
<i>CYLD</i>	<i>Cylindromatosis</i>
<i>C1P</i>	<i>Ceramid 1-Phosphat</i>
<i>DC</i>	<i>Dendritic cell</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxy-ribonucleic acid</i>
<i>dNTP</i>	<i>Desoxy-nucleoside triphosphate</i>
<i>ECL</i>	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
<i>EGTA</i>	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>ER</i>	<i>Endoplasmatischen Retikulum</i>
<i>ERK</i>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>EtOH</i>	<i>Ethanol</i>
<i>FACS</i>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
<i>FCS</i>	<i>Fetal calf serum</i>
<i>FITC</i>	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
<i>Flt3</i>	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
<i>GCase</i>	<i>Glucosylceramidase</i>
<i>GCS</i>	<i>Glucosylceramid Synthase</i>
<i>GluCer</i>	<i>Glucosylceramid</i>
<i>GM-CSF</i>	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
<i>GPCR</i>	<i>G-Protein coupled receptor</i>
<i>HBSS</i>	<i>Hank's balanced salt solution</i>
<i>HDL</i>	<i>High-density lipoprotein</i>
<i>HEPES</i>	<i>N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-ethanesulfonic acid</i>
<i>HRP</i>	<i>Horseradish peroxidase</i>

<i>HUVEC</i>	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<i>IBD</i>	<i>Inflammatory bowel disease</i>
<i>IFN</i>	<i>Interferon</i>
<i>IκB</i>	<i>Inhibitor of nuclear factor-κB</i>
<i>IKK</i>	<i>Inhibitor of nuclear factor-κB kinase</i>
<i>IL</i>	<i>Interleukin</i>
<i>IRAK</i>	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
<i>IRF</i>	<i>Interferon regulatory factor</i>
<i>JNK</i>	<i>C-Jun NH(2)-terminal kinase</i>
<i>JAK</i>	<i>Janus Kinase</i>
<i>kDa</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>KM</i>	<i>Knochenmark</i>
<i>LBP</i>	<i>LPS-binding protein</i>
<i>LC-MS/MS</i>	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
<i>LPDC</i>	<i>Lamina Propria-DC</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharid</i>
<i>Mal</i>	<i>MyD88 adaptor-like</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<i>M-CSF</i>	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
<i>MDP</i>	<i>Macrophage-DC progenitors</i>
<i>MHC</i>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<i>MS</i>	<i>Massenspektroskopie</i>
<i>MyD88</i>	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
<i>NEA</i>	<i>Non essential amino acids</i>
<i>NEMO</i>	<i>NF-κB essential modulator</i>
<i>NF-κB</i>	<i>Nuclear factor-κB</i>
<i>NK</i>	<i>Natürliche Killerzelle</i>
<i>NOD</i>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
<i>PAA</i>	<i>Polyacrylamid</i>
<i>PAMP</i>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<i>Pase</i>	<i>Phosphatase</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>pDC</i>	<i>Plasmacytoid DC</i>
<i>PercP</i>	<i>Peridinin chlorophyll</i>
<i>PI-3K</i>	<i>Phosphatidyl Inositol 3-Kinase</i>
<i>PKB</i>	<i>Protein Kinase B</i>
<i>Poly I:C</i>	<i>Polyinosine-polycytidylic acid</i>
<i>PVDF</i>	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
<i>PRR</i>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<i>RIP1</i>	<i>Receptor interacting protein kinase 1</i>
<i>RLR</i>	<i>Retinoic acid-inducible gene I-like receptors</i>
<i>PMSF</i>	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<i>PtdEtn</i>	<i>Phosphatidylethanolamin</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse Transkriptase PCR</i>
<i>S1P</i>	<i>Sphingosin 1-Phosphat</i>
<i>S1PR</i>	<i>S1P Rezeptor</i>
<i>SEM</i>	<i>Standard error of the mean</i>
<i>SDS</i>	<i>Sodiumdodecyl sulfate</i>
<i>SMase</i>	<i>Sphingomyelinase</i>
<i>SMS</i>	<i>Sphingomyelin Synthase</i>
<i>SPL</i>	<i>S1P Lyase</i>
<i>SphK</i>	<i>Sphingosinkinase</i>

<i>SPP</i>	<i>Sphingosin 1-Phosphatase</i>
<i>SPT</i>	<i>Serin Palmitoyltransferase</i>
<i>ssRNA</i>	<i>Single-stranded RNA</i>
<i>STAT</i>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<i>TAE</i>	<i>Tris Acetate EDTA</i>
<i>TAB</i>	<i>TAK1-binding protein</i>
<i>TAK1</i>	<i>transforming growth factor β-activated kinase 1</i>
<i>TANK</i>	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator</i>
<i>TBK1</i>	<i>TANK binding kinase 1</i>
<i>TBS</i>	<i>Tris-buffered saline</i>
<i>TEMED</i>	<i>N,N,N',N'- tetramethylethylene diamine</i>
<i>Tfh</i>	<i>Follikuläre T-Helferzelle</i>
<i>Th</i>	<i>T-Helferzelle</i>
<i>TICAM-1</i>	<i>TIR domain-containing adaptor molecule-1</i>
<i>TIR</i>	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
<i>TIRAP</i>	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
<i>TLR</i>	<i>Toll-like receptor</i>
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<i>TNFR1</i>	<i>TNF-α receptor 1</i>
<i>TRADD</i>	<i>TNFR1-associated death domain</i>
<i>TRAF</i>	<i>TNF receptor-associated factor</i>
<i>TRAM</i>	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
<i>T_{reg}</i>	<i>Regulatorische T-Helferzelle</i>
<i>TRIF</i>	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
<i>WT</i>	<i>Wild type</i>

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die T-Zell-Differenzierung ist abhängig von der Art des eingedrungenen Pathogens und dem vorherrschenden Zytokinmilieu. _____	5
Abbildung 2: Die Signalweiterleitung nach spezifischer Aktivierung unterschiedlicher TLRs (O'Neill, Luke A J et al., 2013). _____	9
Abbildung 3: Der Sphingolipid-Stoffwechsel (Maceyka and Spiegel, 2014). _____	18
Abbildung 4: Reihenfolge der zu stapelnden Western Blot-Komponenten. (Quelle: www.bio-rad.com (modifiziert)). _____	43
Abbildung 5: IL-12p70 Sekretion aus männlichen mit LPS und TNF- α stimulierten WT- und SphK1 ^{-/-} -KM-DCs sowie Überprüfung der Gendefizienz der SphK1 ^{-/-} -DCs. _____	56
Abbildung 6: IL-12p70 Konzentrationen aus männlichen mit CpG und TNF- α stimulierten WT- und SphK1 ^{-/-} -KM-DCs. _____	57
Abbildung 7: IL-6 Sekretion aus männlichen mit LPS/CpG und TNF- α stimulierten WT- und SphK1 ^{-/-} -KM-DCs. _____	59
Abbildung 8: Immunpräzipitation von TRAF2 und anschließender K63-Ubiquitin Blot bzw. Western Blot von TRAF2 aus stimulierten WT-KM-DCs. _____	60
Abbildung 9: IL-6 Sekretion aus stimulierten WT-KM-DCs. _____	61
Abbildung 10: FACS Analyse der 7-AAD-positiven stimulierten WT- und SphK1 ^{-/-} -KM-DCs. _____	62
Abbildung 11: IL-12p70 Sekretion aus stimulierten WT- und SphK1 ^{-/-} -KM-DCs aus C57BL/6 und BALB/c-Mäusen im Vergleich. _____	64
Abbildung 12: IL-12p35 mRNA-Produktion und IL-12p70 Sekretion aus stimulierten WT-KM-DCs. _____	65
Abbildung 13: IL-12p35 mRNA-Expression sowie IL-12p70- und IL-6 Sekretion aus stimulierten WT-KM-DCs. _____	66
Abbildung 14: Calcium-Zunahme durch Zugabe von S1P in Kombination mit den Spiegelmeren in HEK293-Zellen. _____	68
Abbildung 15: IL-12p70 Sekretion aus WT-KM-DCs, welche mit den S1P-Spiegelmeren inkubiert wurden. _____	69
Abbildung 16: IL-12p70 Sekretion aus WT-KM-DCs, welche mit S1P-Spiegelmeren in Kombination mit LPS und IFN- γ inkubiert wurden. _____	70
Abbildung 17: Reduzierte S1P Lyase-Expression nach TLR-Aktivierung. _____	72
Abbildung 18: Verringerte S1P Lyase-Expression nach Aktivierung der TLRs 1 - 9 in unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Liganden. _____	74
Abbildung 19: Expression von IL-12p35 und IL-12p40 nach Aktivierung der unterschiedlichen TLRs oder nach dosisabhängiger TLR4-Stimulation. _____	75
Abbildung 20: Expression von IL-12p35 und IL-12p40 nach Stimulation der unterschiedlichen TLRs in mehreren Konzentrationen der TLR-Liganden. _____	76
Abbildung 21: Produktion und Sekretion von IL-12p70 und IL-23. _____	78
Abbildung 22: Produktion von IL-12p70 nach dosis-abhängiger Stimulation der jeweiligen TLRs. _____	80
Abbildung 23: IL-23 Sekretion nach dosis-abhängiger Stimulation der unterschiedlichen TLRs. _____	81

Abbildung 24: Produktion der S1P Lyase auf mRNA- und Enzymaktivitätsebene nach zeitabhängiger Aktivierung der KM-DCs. _____	82
Abbildung 25: Kinetiken der SphK1, SphK2 und S1P Phosphatase1 nach Aktivierung der DCs. _____	84
Abbildung 26: Gemessene Konzentrationen des intrazellulären S1P und Sphingosin nach DC-Aktivierung. _____	85
Abbildung 27: IL-12p70 Sekretion nach zeitabhängiger Stimulation der KM-DCs. _____	87
Abbildung 28: Reduziertes Zellüberleben nach TLR4-Aktivierung der DCs. _____	88
Abbildung 29: Die späte LPS-induzierte Apoptose in DCs ist Caspase 3-abhängig. _____	89
Abbildung 30: Durch Tamoxifen induzierbare SPL-Defizienz mit Hilfe der Cre-Rekombinase. _____	90
Abbildung 31: SPL mRNA-Expression aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1 ^{-/-} -KM-DCs. _	92
Abbildung 32: SPL mRNA-Expression aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1 ^{-/-} -KM-DCs. _	93
Abbildung 33: Gemessene S1P Konzentrationen aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1 ^{-/-} -KM-DCs. _____	94
Abbildung 34: Gemessene Sphingosin Konzentrationen aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1 ^{-/-} -KM-DCs. _____	95
Abbildung 35: IL-12p70 Sekretion aus WT-, Tamoxifen-Kontroll- und Tamoxifen-induzierten Sgpl1 ^{-/-} -KM-DCs. ____	96
Abbildung 36: Vorgehen der Induktion der SPL-Defizienz durch Tamoxifen in vivo und Isolation von Knochenmarks- und Milzzellen zur weiteren Analyse. _____	98
Abbildung 37: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten Milzzellen detektiert durch unterschiedlich spezifische Realtime-PCR-Sonden. _____	99
Abbildung 38: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten Milzzellen. _____	100
Abbildung 39: Expression und Sekretion von IL-12p70 aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten Milzzellen. _____	101
Abbildung 40: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten KM-DCs detektiert durch unterschiedlich spezifische Realtime-PCR-Sonden. _____	102
Abbildung 41: SPL-Expression aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten KM-DCs. _____	103
Abbildung 42: salvage-Sphingolipide aus Tamoxifen-induzierten SPL-defizienten KM-DCs. _____	104
Abbildung 43: de novo-Sphingolipide aus Tamoxifen-induzierten SPL-defizienten KM-DCs. _____	105
Abbildung 44: Weitere Sphingolipide aus Tamoxifen-induzierten SPL-defizienten KM-DCs. _____	106
Abbildung 45: Expression und Sekretion von IL-12p70 aus induzierten SPL-defizienten und stimulierten KM-DCs. _____	107
Abbildung 46: IL-12-p70 Sekretion aus WT-KM-DCs, welche mit LPS und 4-Deoxypyridoxin inkubiert wurden. ____	109
Abbildung 47: Schematische Darstellung zur Übersicht der zeitabhängigen Modulation in KM-DCs. _____	124

8.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Substanzen bzw. TLR-Liganden, welche zu den Zellen gegeben worden sind.</i>	33
<i>Tabelle 2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen für SDS-Page.</i>	41
<i>Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper zur Durchführung des Western Blots.</i>	44
<i>Tabelle 4: Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermixes.</i>	48
<i>Tabelle 5: Primer für die Genotypisierungen.</i>	49
<i>Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermixes für die qualitative PCR.</i>	49
<i>Tabelle 7: PCR-Programm der entsprechenden Genotypisierungen.</i>	50
<i>Tabelle 8: Primer für die PCR unterschiedlicher Exon-Bereiche der S1P Lyase.</i>	51
<i>Tabelle 9: PCR-Programm für die Amplifikation der S1P Lyase-Exons.</i>	51
<i>Tabelle 10: Reaktionsansatz für die quantitative Realtime-PCR.</i>	52

8.4 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

8.4.1 Veröffentlichungen

Die vorliegende Arbeit wurde zu einem Teil zum Manuskript zusammengefasst und zur Publikation vorbereitet:

Olga Arlt*, Anja Schwiebs*, Elisabeth Katzy, Kathrin Pfarr, Annika Wagner, Nerea Ferreirós Bouzas, Yannick Schreiber, Corinna Neuber, Burkhard Kleuser, Josef M. Pfeilschifter, Heinfried H. Radeke (2014). Differential regulation of S1P metabolizing enzymes in TLR-stimulated dendritic cells is associated with activation-induced cell death. *beide sind Erstautoren.

Weitere Publikationen:

Olga Arlt*, Anja Schwiebs*, Lukasz Japtok, Katja Rüger, Elisabeth Katzy, Burkhard Kleuser, Heinfried H. Radeke (2014). Sphingosine-1-phosphate modulates dendritic cell function: focus on non-migratory effects in vitro and in vivo. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2014;34(1):27-44. doi: 10.1159/000362982. Review. *beide sind Erstautoren.

Matthias Schröder, **Olga Arlt**, Helmut Schmidt, Andrea Huwiler, Carlo Angioni, Josef M. Pfeilschifter, Anja Schwiebs, Heinfried H. Radeke (2015). Subcellular distribution of FTY720 and FTY720-phosphate in immune cells - another aspect of Fingolimod action relevant for therapeutic application. *Biological Chemistry* 2015 Jan 14. pii: /j/bchm.just-accepted/hsz-2014-0287/hsz-2014-0287.xml. doi: 10.1515/hsz-2014-0287

Kathrin Pfarr, Corina Danciu, **Olga Arlt**, Christina Neske, Cristina Dehelean, Josef M. Pfeilschifter, Heinfried H. Radeke (2015). Simultaneous and dose dependent melanoma cytotoxic and immune stimulatory activity of betulin. *PLoS One* 2015 Mar 10;10(3):e0118802. doi: 10.1371/journal.pone.0118802

8.4.2 Kongressbeiträge

Postererstellung und -präsentation:

2011 Joint Annual Meeting of DGfI and SIICA (German Society for Immunology and Italian Society for Immunology, Clinical Immunology and Allergology), Riccione Italien: Olga Arlt, Oliver Giegold, Christina Neske, Matthias Schröder, Josef M. Pfeilschifter and Heinfried H. Radeke (2011). Modulation of dendritic cell cytokine profiles via extra- and -intracellular targets of sphingolipids.

78. Jahrestagung der DGPT (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie), Dresden: Olga Arlt, Christina Neske, Nadine Ogrissek, Dagmar Meyer zu Heringdorf, Josef M. Pfeilschifter and Heinfried H. Radeke (2012). Modulation of dendritic cell cytokine profiles via extra- and intracellular targets of sphingolipids. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2012.

7th WIRM (World Immune Regulation Meeting), Davos Schweiz: Olga Arlt, Josef M. Pfeilschifter, Heinfried H. Radeke (2013). In dendritic cells TLR-dependent induction of IL-12p70 is accompanied by a profound down regulation of S1P lyase mRNA.

Postererstellung:

AAI (American Association of Immunologists) Annual Meeting, Honolulu Hawaii: Olga Arlt, Josef M. Pfeilschifter, Heinfried H. Radeke (2013). In dendritic cells TLR-dependent induction of IL-12p70 is accompanied by a profound down regulation of S1P lyase mRNA. *The Journal of Immunology*.

80. Jahrestagung der DGPT, Hannover: Olga Arlt, Anja Schwiebs, Kathrin Pfarr, Annika Ranglack, Nerea Ferreirós Bouzas, Yannick Schreiber, Corinna Neuber, Burkhard Kleuser, Josef M. Pfeilschifter and Heinfried H. Radeke (2014). Dynamic interaction between sphingolipid enzymes, S1P and inflammatory cytokine regulation in dendritic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2014.

9 Danksagung

Ich bedanke mich insbesondere ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Heinfried H. Radeke für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Gruppe durchzuführen. Seine fachliche und persönliche Unterstützung, hilfreiche Diskussionen sowie die bereitgestellte Freiheit in der wissenschaftlichen Ausgestaltung dieser Arbeit haben mir entscheidend weitergeholfen. Vielen Dank auch für die Finanzierung durch DFG SPP1267 „Sphingolipids - Signals and Disease“ und die Möglichkeit an Kursen des Graduiertenkollegs teilnehmen zu dürfen.

Bei Prof. Dr. Beatrix Süß bedanke ich mich für die problemlose Übernahme der fachinternen Betreuung an der TU Darmstadt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfe, ihre Beteiligung und Interesse an dieser Arbeit bedanken. Vor Allem aber danke für die persönliche Unterstützung im Labor und die gemeinsame Zeit! Ich bedanke mich auch bei den ehemaligen Kollegen und Kolleginnen, Dr. Matthias Schröder, Dr. Oliver Giegold, Christina Neske und Claudia Hofschulte, für die Erklärungen und Einarbeitung am Anfang der Arbeit, die hilfreiche Unterstützung und Integration in die Gruppe!

Ich danke Herrn Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter für die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie anfertigen zu können. Danke für das angenehme Arbeitsklima. Für die Bereitstellung der SphK1-defizienten Tiere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter und Prof. Dr. Andrea Huwiler. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Scholich für die SphK1-defizienten Mäuse auf BALB/c-Hintergrund. Danke an Prof. Dr. Burkhard Kleuser für seine Unterstützung und Ermöglichung Hexadecenal in seinem Labor messen zu lassen. Ganz lieben Dank an Corinna Neuber und ihr Laborteam für die Messung meiner Proben. Danke an Dr. Nerea Ferreirós Bouzas und Yannick Schreiber für die hilfreichen Diskussionen und Sphingolipid-Messungen aus meinen zahlreichen Zell-Proben. Danke an die Novartis Pharma AG für die Bereitstellung der SPL^{Flox/Flox} Cre^{-/-} - und SPL^{Flox/Flox} Cre^{+/-}-Mauslinien. Vielen Dank auch an die Betreuer dieser Tiere sowie an alle Mitarbeiter der zentralen Tierhaltung für die Zucht und Pflege aller für diese Arbeit

verwendeten Mäuse. Danke an die NOXXON Pharma AG für das entgegengebrachte Vertrauen und die Spiegelmer-Proben.

Vielen Dank an meine Betreuer innerhalb der beiden Graduiertenkollegs „HKG - Dr. Hans Kröner GRK“ und „GRK 1172 - Biologicals“ von FIRST („Frankfurt International Research Graduate School for Translational Biomedicine“), Univ.-Prof. Dr. Dieter Steinhilber und Prof. Dr. Beatrix Süß, für die interessanten Diskussionen und hilfreichen Vorschläge. Auch bei dem organisatorischen Team sowie den Doktoranden dieser beiden Kollegs möchte ich mich für die wissenschaftlichen Anregungen und die lockere Atmosphäre herzlich bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner gesamten Familie und meinen Freunden. Danke für eure Liebe, Verständnis, Vertrauen und unaufhörliche Unterstützung während der gesamten Zeit! Insbesondere bedanke ich mich bei Paul, der mir immer liebevoll mit Rat zur Seite stand und mir unglaubliche Motivation und Kraft gegeben hat, Danke!

10 Lebenslauf

Olga Arlt
Wohnhaft: Bertha-Von-Suttner-Str. 2, 64560 Riedstadt
Mail: olgaarlt@hotmail.com
Fon: 0176 21323565
Geboren: 15.10.1983 in Frunse (Kirgisistan)
Nationalität: deutsch

Werdegang

- | | |
|--------------|---|
| Seit 12/2010 | <p>Promotion</p> <p>Institut für Pharmakologie und Toxikologie des
Universitätsklinikums der Goethe-Universität Frankfurt am Main</p> <p>Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heinfried H. Radeke
(Immunpharmakologie)</p> <p>Teilnahme am PhD-Graduiertenkolleg „GRK 1172 - Biologicals“
und „HKG - Dr. Hans Kröner GRK“, FIRST</p> |
| 2009 - 2010 | <p>Diplomarbeit</p> <p>Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz:
Untersuchungen des Einflusses der Deubiquitinase CYLD auf die
Funktion muriner Mastzellen</p> |
| 2004 - 2010 | <p>Studium der Biologie</p> <p>Johannes Gutenberg-Universität Mainz</p> <p>Schwerpunkt-Fächer: Immunologie, Mikrobiologie und Genetik</p> <p>Nebenfächer: Zoologie, Bioinformatik</p> <p>Abschluss als Diplom-Biologin mit der Gesamtnote 1,2</p> |
| 1990 - 2003 | <p>Schulbesuch in Kirgisistan und Deutschland</p> <p>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife</p> |

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 30.03.2015

Olga Arlt